



Werkzeugkasten Naturschutzgenetik: eDNA Amphibien und Verbund

Holderegger, R ; Stapfer, A ; Schmidt, Benedikt R ; Grünig, C ; Meier, R ; Csencsics, D ; Gassner, M

Abstract: Die Aufgabe, Gelder möglichst wirksam und am richtigen Ort einzusetzen, stellt im Naturschutz angesichts der beschränkten Mittel und des gleichzeitig grossen Handlungsbedarfs eine besondere Herausforderung dar. Problematisch ist beispielsweise, dass bei der Biodiversitätsförderung oftmals eine Wirkungskontrolle der Massnahmen schwierig oder mit grossem Aufwand verbunden ist. Die in den letzten Jahren zunehmend angewandten genetischen Methoden zum Nachweis von Arten sowie zur Erfassung von Vernetzung von Populationen und Lebensräumen haben gezeigt, dass die Anwendung der Genetik die Naturschutzpraxis bei verschiedenen Fragestellungen wesentlich unterstützen kann. Noch werden aber genetische Methoden in der Naturschutzpraxis selten angewandt. Der neu entwickelte Werkzeugkasten Naturschutzgenetik bietet der Naturschutzpraxis Abläufe beziehungsweise Workflows an, welche es erlauben genetische Methoden im Naturschutz routinemässig einzusetzen. Hauptbestandteil des Werkzeugkastens Naturschutzgenetik sind bezüglich Aufwand und Ertrag erprobte, einfache und transparente Workflows mit illustrierten Anleitungen für das Probenahmedesign, das Sammeln von Proben im Feld, die Analysen im Labor, standardisierte statistische Auswertungen sowie die einfache benutzerorientierte Darstellung der Resultate und deren Interpretation zuhanden der Naturschutzpraxis (Bund, Kantone, Umweltbüros, NGOs). Das gezielte Ausrichten auf für den Naturschutz wichtige und relevante Fragestellungen trägt dazu bei, das Potential der genetischen Methoden für den Alltag im Naturschutz nutzbar zu machen und die Naturschutzgenetik in der Praxis zu etablieren. Es wurden zwei Abläufe oder Workflows für den routinemässigen und standardisierten Einsatz von genetischen Methoden im Naturschutz eingeführt (für aktuelle Informationen siehe www.naturschutzgenetik.ch). Erstens wurde ein genetischer Nachweis der in der Schweiz in Weihern und Teichen vorkommenden Amphibienarten aufgrund von eDNA (Umwelt-DNA) aus Wasserproben etabliert. Damit können auch Amphibienarten nachgewiesen werden, die mit herkömmlichen Methoden nur schwer nachweisbar sind (z. B. Kammolch, *Triturus cristatus*, Teichmolch, *Lissotriton vulgaris*) oder im Feld morphologisch nicht unterscheidbar sind (z. B. invasive Wasserfrösche, *Pelophylax* sp.). Zweitens wurde ein Workflow für die Untersuchung von Vernetzung beziehungsweise Isolation von Populationen und Lebensräumen mittels genetischer Methoden (Mikrosatelliten) entwickelt. Zurzeit sind genetische Methoden die einzigen, welche allgemein und für alle Organismengruppen mit vertretbarem Aufwand anwendbar sind, um Vernetzung auf Landschaftsebene festzustellen. Die beiden entwickelten Workflows sind so konzipiert, dass sie auf viele Ziellebensräume und Zielarten des Naturschutzes übertragbar sind. Der Werkzeugkasten Naturschutzgenetik ist somit einfach erweiterbar. Bereits wird der Workflow eDNA aufgrund des Interesses von AnwenderInnen um weitere Organismengruppen (z. B. Libellen) erweitert. Mit dem Werkzeugkasten Naturschutzgenetik soll es gelingen, die Nutzung der Naturschutzgenetik mit ihren vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten in der Naturschutzpraxis in der Schweiz zu verankern.

Published Version

Originally published at:

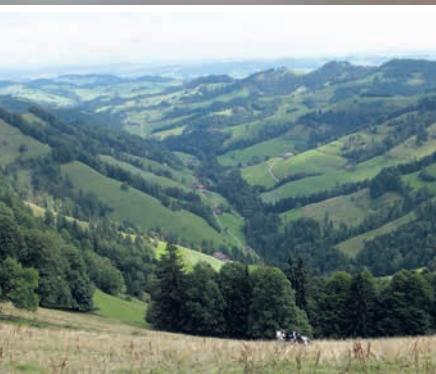
Holderegger, R; Stapfer, A; Schmidt, Benedikt R; Grünig, C; Meier, R; Csencsics, D; Gassner, M (2019). Werkzeugkasten Naturschutzgenetik: eDNA Amphibien und Verbund. Birmensdorf: Eidg. Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft WSL.



Heft 81, 2019

WSL Berichte

ISSN 2296-3456



Werkzeugkasten Naturschutz- genetik: eDNA Amphibien und Verbund

Rolf Holderegger
André Stapfer
Benedikt Schmidt
Christoph Grünig
Robert Meier
Daniela Csencsics
Martin Gassner



Eidg. Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft WSL
CH-8903 Birmensdorf

Heft 81, 2019

WSL Berichte

ISSN 2296-3456

Werkzeugkasten Naturschutz- genetik: eDNA Amphibien und Verbund

Rolf Holderegger
André Stapfer
Benedikt Schmidt
Christoph Grünig
Robert Meier
Daniela Csencsics
Martin Gassner



Eidg. Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft WSL
CH-8903 Birmensdorf

Verantwortlich für die Herausgabe der Schriftenreihe
Prof. Dr. Konrad Steffen, Direktor WSL

Verantwortlich für dieses Heft

Rolf Holderegger, Daniela Csencsics: Eidgenössische Forschungsanstalt WSL,
Zürcherstrasse 111, CH-8903 Birmensdorf

André Stapfer: HSR Hochschule für Technik Rapperswil, Oberseestrasse 10,
CH-8640 Rapperswil-Jona

Benedikt Schmidt: Department of Evolutionary Biology and Environmental Studies,
Universität Zürich, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zürich

Christoph Grünig: ecogenics und Microsynth, Schützenstrasse 15, CH-9436 Balgach

Robert Meier, Martin Gassner: ARNAL, Büro für Natur und Landschaft AG, Kasernen-
strasse 37, CH-9100 Herisau

Schriftleitung: Sandra Gurzeler, Teamleiterin Publikationen, WSL

Lektorat: Sandra Gurzeler, WSL

Layout: Jacqueline Annen, WSL

Zitiervorschlag:

Holderegger, R.; Stapfer, A.; Schmidt, B.; Grünig, C.; Meier, R.; Csencsics, D.;

Gassner, M., 2019: Werkzeugkasten Naturschutzgenetik: eDNA Amphibien und Verbund.
WSL Ber. 81. 56 S.

ISSN 2296-3448 (Print)

ISSN 2296-3456 (Online)

Fotos Umschlag:

1. Wildtierdurchlass Suret, Kanton Aargau (Foto: Martin C. Fischer)
2. Grosse Höckerschrecke (*Arcyptera fusca*; Foto: André Stapfer)
3. Magerwiese (Foto: André Stapfer)
4. Gelbbauchunke (*Bombina variegata*; Foto: Benedikt Schmidt)
5. Tössbergland (Foto: Rolf Holderegger)
6. Pyramiden-Orchidee (*Anacamptis pyramidalis*; Foto: Rolf Holderegger)



Forschung für Mensch und Umwelt: Die Eidg. Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft WSL überwacht und erforscht Wald, Landschaft, Biodiversität, Naturgefahren sowie Schnee und Eis. Sie ist ein Forschungsinstitut des Bundes und gehört zum ETH-Bereich. Das WSL-Institut für Schnee und Lawinenforschung SLF ist seit 1989 Teil der WSL.

© Eidg. Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft WSL
Birmensdorf, 2019

Zusammenfassung

Die Aufgabe, Gelder möglichst wirksam und am richtigen Ort einzusetzen, stellt im Naturschutz angesichts der beschränkten Mittel und des gleichzeitig grossen Handlungsbedarfs eine besondere Herausforderung dar. Problematisch ist beispielsweise, dass bei der Biodiversitätsförderung oftmals eine Wirkungskontrolle der Massnahmen schwierig oder mit grossem Aufwand verbunden ist. Die in den letzten Jahren zunehmend angewandten genetischen Methoden zum Nachweis von Arten sowie zur Erfassung von Vernetzung von Populationen und Lebensräumen haben gezeigt, dass die Anwendung der Genetik die Naturschutzpraxis bei verschiedenen Fragestellungen wesentlich unterstützen kann. Noch werden aber genetische Methoden in der Naturschutzpraxis selten angewandt.

Der neu entwickelte Werkzeugkasten Naturschutzgenetik bietet der Naturschutzpraxis Abläufe beziehungsweise Workflows an, welche es erlauben genetische Methoden im Naturschutz routinemässig einzusetzen. Hauptbestandteil des Werkzeugkastens Naturschutzgenetik sind bezüglich Aufwand und Ertrag erprobte, einfache und transparente Workflows mit illustrierten Anleitungen für das Probenahmedesign, das Sammeln von Proben im Feld, die Analysen im Labor, standardisierte statistische Auswertungen sowie die einfache benutzerorientierte Darstellung der Resultate und deren Interpretation zuhanden der Naturschutzpraxis (Bund, Kantone, Umweltbüros, NGOs). Das gezielte Ausrichten auf für den Naturschutz wichtige und relevante Fragestellungen trägt dazu bei, das Potential der genetischen Methoden für den Alltag im Naturschutz nutzbar zu machen und die Naturschutzgenetik in der Praxis zu etablieren.

Es wurden zwei Abläufe oder Workflows für den routinemässigen und standardisierten Einsatz von genetischen Methoden im Naturschutz eingeführt (für aktuelle Informationen siehe www.naturschutzgenetik.ch). Erstens wurde ein genetischer Nachweis der in der Schweiz in Weihern und Teichen vorkommenden Amphibienarten aufgrund von eDNA (Umwelt-DNA) aus Wasserproben etabliert. Damit können auch Amphibienarten nachgewiesen werden, die mit herkömmlichen Methoden nur schwer nachweisbar sind (z.B. Kammmolch, *Triturus cristatus*, Teichmolch, *Lissotriton vulgaris*) oder im Feld morphologisch nicht unterscheidbar sind (z.B. invasive Wasserfrösche, *Pelophylax* sp.). Zweitens wurde ein Workflow für die Untersuchung von Vernetzung beziehungsweise Isolation von Populationen und Lebensräumen mittels genetischer Methoden (Mikrosatelliten) entwickelt. Zurzeit sind genetische Methoden die einzigen, welche allgemein und für alle Organismengruppen mit vertretbarem Aufwand anwendbar sind, um Vernetzung auf Landschaftsebene festzustellen.

Die beiden entwickelten Workflows sind so konzipiert, dass sie auf viele Ziellebensräume und Zielarten des Naturschutzes übertragbar sind. Der Werkzeugkasten Naturschutzgenetik ist somit einfach erweiterbar. Bereits wird der Workflow eDNA aufgrund des Interesses von AnwenderInnen um weitere Organismengruppen (z.B. Libellen) erweitert. Mit dem Werkzeugkasten Naturschutzgenetik soll es gelingen, die Nutzung der Naturschutzgenetik mit ihren vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten in der Naturschutzpraxis in der Schweiz zu verankern.

Summary

While there is a clear need for timely action in conservation management, effective nature conservation is often hindered by insufficient financial resources. One problem is that studies on the effectiveness of taken conservation actions are difficult to carry out or are cost-intensive. Recently, the increased use of genetic methods in the identification of species or for the evaluation of connectivity or fragmentation of populations has shown that conservation genetics could support conservation management in answering many questions of practical relevance. However, genetic methods are still rarely used by conservation professionals.

Here, a conservation genetics tool kit, which offers ready-to-use workflows is presented. These workflows allow for the routine use of genetic methods in nature conservation. The main parts of the tool kit are workflows optimized for labour and costs. They give easy-to-read and illustrated guidance regarding sample design, sampling of genetic material, laboratory work, standardized statistical analyses, presentation of user-oriented results and the interpretation of the results in conservation practice (federal and cantonal authorities, private consultancies, NGOs). The conservation genetics tool kit's clear focusing on important and relevant questions of conservation practice ensures the accessibility of the potential of genetic methods in nature conservation and fosters the increased use of conservation genetics in conservation management.

Two different workflows for the routine and standardized use of genetic methods in nature conservation were established (for up-to-date information see www.naturschutzgenetik.ch). First, a genetic tool for the identification of pond-breeding amphibians in Switzerland based on environmental DNA (eDNA) from water samples was set up. With this method, also amphibian species that are difficult to detect with traditional field methods (e.g. crested newt, *Triturus cristatus*, smooth newt, *Lissotriton vulgaris*) or cannot be morphologically determined in the field (e.g. invasive water frogs, *Pelophylax* sp.) can be identified. A second workflow enables the study of the isolation or connectivity of populations or habitats using genetic methods (microsatellites). Currently, genetic methods are the only ones which allow – with a reasonable effort – an evaluation of the level of connectivity at the landscape scale for (almost) all groups of organisms.

These two workflows are set up to be easily transferable to other target species and habitats in conservation management. The scope of the conservation genetics tool kit can thus easily be enlarged. Due to the interest of stakeholders, the eDNA workflow is currently applied to and optimized for other organismic groups (e.g. dragonflies and damselflies). The conservation genetics tool kit facilitates a more routine use of conservation genetics in conservation practice and its manifold applications in Switzerland.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Summary	4
1 Einleitung	7
1.1 Anwendung genetischer Methoden im Naturschutz	7
1.2 Ein Werkzeugkasten Naturschutzgenetik für die Praxis	7
1.3 Nachweis von Amphibienarten mit eDNA	8
1.4 Verbund von Populationen und Lebensräumen	8
1.5 Zielpublikum des Werkzeugkastens Naturschutzgenetik	9
2 Workflow Amphibiennachweis mit eDNA	11
2.1 Fragestellung	11
2.2 Welche Amphibienarten können in Weihern mit eDNA nachgewiesen werden?	12
2.2.1 Spezialfall Wasserfrösche	12
2.2.2 Spezialfall Alpen- und Feuersalamander	13
2.3 Mehrwert von eDNA Untersuchungen	13
2.4 Ablauf einer eDNA Untersuchung für Amphibien	15
2.5 Probenahme und Probenahmedesign	15
2.5.1 Einzelgewässer	17
2.5.2 Gewässer-Komplex	18
2.5.3 Spezialfälle	18
2.6 Labormethoden	19
2.6.1 Auswahl der DNA-Sequenz für das Metabarcoding	19
2.6.2 Aufbau der Referenzdatenbank	20
2.6.3 Etablierung und Optimierung der Labormethode	20
2.6.4 Darstellung der Resultate	20
2.7 Interpretation der Resultate	21
2.7.1 Nachweis von Amphibien-Vorkommen	21
2.8 Kosten	21
3 Workflow Verbund	22
3.1 Fragestellung	22
3.2 Welche Arten eignen sich?	24
3.3 Probenahmedesign	24
3.3.1 Was ist eine Population?	24
3.3.2 Prinzipien für die Auswahl und Anzahl untersuchter Populationen	27
3.3.3 Wie viele Individuen pro Population werden beprobt?	30
3.3.4 Spezialfall, wenn Individuen nicht Populationen zugeordnet werden können	31
3.3.5 Betretbewilligungen für die untersuchten Gebiete	31
3.4 Probenahme	32
3.4.1 Probenahme bei verschiedenen Organismengruppen	32
3.4.2 Beeinträchtigung von Tieren durch die Probenahme	36
3.4.3 Probenahmewilligungen	37
3.5 Labormethoden	37
3.5.1 Was sind Mikrosatelliten?	37
3.5.2 Sind Mikrosatelliten vorhanden oder müssen sie neu hergestellt werden?	38
3.5.3 Laborprotokoll	38
3.5.4 Tabelle der genetischen Zusammensetzung der untersuchten Individuen	39
3.6 Statistische Standardauswertungen	39
3.6.1 Genetische Gruppen	39

3.6.2	Austausch über viele Generationen hinweg und Isolation durch die Distanz	41
3.6.3	Austauschraten über die letzten Generationen hinweg	41
3.6.4	Aktuelle Wanderer	41
3.6.5	Barrierewirkung	41
3.6.6	Spezielle Untersuchungen verlangen spezielle Probenahmedesigns und spezielle Auswertungen	41
3.7	Interpretation der Resultate	42
3.7.1	Genetische Gruppen	42
3.7.2	Austausch über viele Generationen hinweg und Isolation durch die Distanz	43
3.7.3	Austauschraten über die letzten Generationen hinweg	45
3.7.4	Aktuelle Wanderer	46
3.7.5	Barrierewirkung	47
3.8	Kosten	52
4	Fazit und Ausblick	53
5	Dank	54
6	Literatur	55
Kasten 1.	Wissen zur Naturschutzgenetik	7
Kasten 2.	Beispiel einer Spezialbeprobung	18
Kasten 3.	Beispiel einer Standardauswertung des Workflows eDNA Amphibien	21
Kasten 4.	Nicht-invasive Probenahme	36
Kasten 5.	Beispiel einer statistischen Standardauswertung im Workflow Verbund: Gelbbauchunke	49

1 Einleitung

1.1 Anwendungen genetischer Methoden im Naturschutz

Bund und Kantone investieren jährlich rund 300 Mio. CHF in die Erhaltung und die Aufwertung der Biotope von nationaler Bedeutung. Zusammen mit den Aufwendungen für die kantonalen und lokalen Schutzgebiete und den Artenschutz sowie mit den Direktzahlungen des Bundes an die Landwirtschaft dürften die jährlichen, in der Schweiz getätigten Investitionen zur Förderung der Biodiversität deutlich über 400 Mio. CHF betragen (ISMAIL *et al.* 2009). Zudem sind im Rahmen der flächigen Einführung der wirkungsorientierten Verwaltung in den letzten Jahren Wirkungskontrollen auch im Naturschutz zur Pflicht geworden. Alleine die Kantone Aargau, Bern und Zürich geben jährlich rund 1 Mio. CHF für Erfolgskontrollen und Monitoringprojekte aus. Auch das Forschungskonzept des Bundesamts für Umwelt (BAFU) für die Jahre 2017 bis 2020 sieht als prioritäres Thema beim Bereich Biodiversität die Optimierung der Monitoringmethoden für Arten und Lebensräume und Erfolgskontrollen von Massnahmen zur Förderung der Biodiversität vor (BAFU 2016). Der Bedarf nach aussagekräftigen Erfolgskontrollen ist somit gross. Insbesondere bei der Vernetzung von Lebensräumen ist über die Wirkung der angewandten Massnahmen aber wenig bekannt. Die zu beantwortenden Fragen sind mit herkömmlichen ökologischen Methoden oft nur aufwendig oder gar nicht zu beantworten. Ein optimaler Mitteleinsatz ist deshalb nicht immer gewährleistet.

Neue Methoden haben in den letzten Jahren die genetische Analyse bei Pflanzen und Tieren revolutioniert. Die enormen technischen Fortschritte führen dazu, dass Genetik für Anwendungsbereiche in der Naturschutzpraxis nutzbar wird (Naturschutzgenetik; FRANKHAM *et al.* 2010, 2017; HOLDEREGGER und SEGELBACHER 2016). Genetik kann die Naturschutzpraxis bei verschiedenen Fragestellungen wesentlich unterstützen, so etwa beim Nachweis von Arten mittels eDNA (environmental DNA) beziehungsweise Umwelt-DNA oder beim Nachweis der Vernetzung von Populationen und Lebensräumen. Auch der Aktionsplan zur Strategie Biodiversität des Bundesrats weist auf das Potential genetischer Methoden für die Biodiversitätsförderung hin und möchte den Zugang der Naturschutzpraxis zu diesen Methoden fördern (BAFU 2017). Noch fehlt es der Naturschutzpraxis an Wissen über die Möglichkeiten und Grenzen genetischer Methoden. Die Anwendung genetischer Methoden in der Naturschutzpraxis beschränkt sich deshalb bis heute auf einzelne, spezielle Projekte. Meist handelt es sich dabei um in Zusammenarbeit mit Forschungsinstitutionen durchgeführte Untersuchungen. Noch ist es ein weiter Weg, bis der routinemässige Einsatz von genetischen Methoden im Naturschutz stattfindet.

1.2 Ein Werkzeugkasten Naturschutzgenetik für die Praxis

Um die Verwendung von genetischen Methoden in der Naturschutzpraxis zu fördern und zu etablieren, entwickelte ein Team von Forschungsinstituten und von Partnern aus Wirtschaft und Naturschutzpraxis (HS Rapperswil, Universität Zürich, WSL, ARNAL, ecogenics und Microsynth) seit 2016 mit Unterstützung von InnoSuisse, des Bundesamtes für Umwelt und verschiedener Kantone einen marktfähigen Werkzeugkasten Naturschutzgenetik. Dieser liegt hier in einer ersten Version vor. Hauptbestandteil des entwickelten Werkzeugkastens sind genau beschriebene und erprobte Abläufe beziehungsweise Workflows für bestimmte genetische Anwendungen, vom Erstellen eines Probenahmedesigns, über das Sammeln von Proben im Feld, die Analysen im Labor, die statistischen Auswertungen, die benutzerfreundliche Darstellung und Interpretation der Resultate bis zur Abschätzung der ungefähren Kosten (wie diese im Rahmen des Projekts Werkzeugkasten Naturschutzgenetik durch die beteiligten Wirtschafts- und Praxispartner ermittelt wurden; Kasten 1). Dabei wurde darauf geachtet, dass durch das gezielte Ausrichten der Workflows auf die Optimierung des Arbeitsaufwands und der Kosten sowie auf für den Naturschutz wichtige Fragestellungen, das Potential der genetischen Methoden für den Alltag im Naturschutz nutzbar gemacht wurde. So wird auch ein entsprechender Markt für private Dienstleister wie Umweltbüros und spezialisierte Firmen geschaffen. Der Werkzeugkasten Naturschutzgenetik beschränkt sich vorerst auf das Lösen ausge-

wählter, für die Effizienz der täglichen Naturschutzarbeit besonders wichtiger und häufig wiederkehrender Aufgabestellungen. Es wurden – gestützt auf eine Bedürfnisabklärung bei den Schweizer Kantonen – zwei standardisierte und praxistaugliche genetische Workflows etabliert (Kapitel 1.3, 1.4).

Kasten 1. Wissen zur Naturschutzgenetik

Generelles Hintergrundwissen über die für die Naturschutzarbeit nutzbaren genetischen Methoden enthalten die folgenden Publikationen:

- HOLDEREGGER, R.; SEGELBACHER, G. (Hrsg.) 2016: Naturschutzgenetik. Ein Handbuch für die Praxis. Bern, Haupt.
- CSENSICS, D.; GUGERLI, F. (Hrsg.) 2017: Naturschutzgenetik. WSL Berichte 60: 1–81. (gratis herunterladbar auf www.wsl.ch/berichte)

Informationen für konkrete Anwendungen des Werkzeugkastens Naturschutzgenetik in der Praxis findet sich unter:

- www.naturschutzgenetik.ch

Die technischen Anleitungen auf dieser Webseite werden regelmässig aktualisiert, es werden Praxisbeispiele vorgestellt und es wird angegeben, mit welchen Kosten bei einer naturschutzgenetischen Untersuchung zu rechnen ist.

1.3 Nachweis von Amphibienarten mit eDNA

Welche Amphibienarten kommen in einem Weiher vor? Der Werkzeugkasten Naturschutzgenetik unterstützt die Naturschutzarbeit beim Nachweis von Amphibienarten (Abb. 1). Dabei werden die in einem Gebiet vorkommenden Arten aufgrund vorgefundener DNA-Spuren im Wasser identifiziert. In Gewässern finden sich Zellen, welche Organismen ausscheiden und über ihre Oberfläche verlieren oder es finden sich freie DNA-Molekülen von Organismen im Wasser. Mittels dieser eDNA geschieht im Labor die gleichzeitige Identifizierung aller im Weiher vorkommenden Amphibienarten anhand eines kurzen Stücks der DNA, einem sogenannten Barcode. Die Artbestimmung erfolgt im Abgleich mit einer Referenz-Datenbank für alle Amphibienarten der Schweiz und des angrenzenden Auslands.

Mit Hilfe dieses genetischen Artnachweises lassen sich auch Arten nachweisen, die mit herkömmlichen Methoden nur mit erheblichem Aufwand auffindbar sind (z. B. Kammmolch, *Triturus cristatus*, Teichmolch, *Lissotriton vulgaris*) oder im Feld morphologisch nicht unterscheidbar sind (invasive Wasserfrösche der Gattung *Pelophylax* oder Italienischer Kammmolch, *T. carnifex*). Zudem erlaubt die Methode des Werkzeugkastens Naturschutzgenetik mehr Flexibilität, da die Probenahme auch tagsüber und bei ungeeigneten Wetterverhältnissen durchgeführt werden kann.

Der Workflow Amphibiennachweis in Weihern und Teichen mittels eDNA ist in Kapitel 2 genauer beschrieben.

1.4 Verbund von Populationen und Lebensräumen

Sind die Vorkommen einer Art miteinander verbunden oder führen neu geschaffene Trittsteinbiotope zur besseren Vernetzung von Populationen und Lebensräumen? Dies sind für die Naturschutzpraxis relevante und häufige Fragestellungen im Bereich Verbund (Abb. 2). Die Fragmentierung und Isolation von Lebensräumen gilt neben dem Lebensraumverlust als eine der Hauptursachen für den Rückgang der Biodiversität. Zerschnittene Lebensräume und ihre Populationen miteinander zu vernetzen und in einem Verbund zu integrieren ist auch ein wichtiges Ziel der geplanten ökologischen Infrastruktur in der Schweiz, dem Hauptziel des vom Bundesrat verabschiedeten Aktionsplans Strategie Biodiversität Schweiz (BAFU 2017). Allerdings ist es mit herkömmlichen Methoden schwierig und teuer festzustellen, ob Populationen miteinander in Verbindung



Abb. 1. Der Werkzeugkasten Naturschutzgenetik weist Amphibienarten der Schweiz in allen Lebensstadien in Stillgewässern mittels eDNA aus Wasserproben nach (links: eine Kammolch-Larve, *Triturus cristatus*; Fotos: André Stapfer).

stehen und Individuen – und damit auch Gene – untereinander austauschen. Dies ist aber mit genetischen Methoden möglich.

Ziel des Workflows Verbund im Werkzeugkasten Naturschutzgenetik ist es, der Naturschutzpraxis eine einfache Anleitung für den standardmässigen Einsatz von genetischen Methoden für die Erfassung der bestehenden Vernetzung oder der Isolation beziehungsweise des Erfolgs von bereits getroffenen Vernetzungsmassnahmen auf Landschaftsebene anzubieten. Hierfür wird die genetische Ähnlichkeit von Individuen aus verschiedenen Populationen einer Art (mit sogenannten Mikrosatelliten) verglichen. Im Unterschied zur Methodik bei eDNA für den Nachweis des Vorkommens von Amphibienarten (Kapitel 1.3) erfolgt hier die Beprobung direkt am Individuum. Mikrosatelliten sind artspezifische, kurze Abschnitte der DNA. Dank ihrer grossen Variabilität lassen sich mit Mikrosatelliten die Individuen einer Art unterscheiden, denn durch die Kombination von mehreren Mikrosatelliten, hat jedes Individuum einen einzigartigen genetischen Fingerabdruck.

Der Workflow Verbund ist in Kapitel 3 genauer beschrieben.

1.5 Zielpublikum des Werkzeugkastens Naturschutzgenetik

Der Werkzeugkasten Naturschutzgenetik ist auf die Bedürfnisse von potentiellen Auftraggebern (Bund, Kantone, andere Behörden, NGOs) und Auftragnehmern (Umweltbüros, private Firmen) ausgerichtet.

Neben der öffentlichen Hand ist die Privatwirtschaft im Rahmen von Bauprojekten (u.a. Baubewilligungs- und Umweltverträglichkeits-Prüfungen UVP) gesetzlich verpflichtet Vorabklärungen zur Biodiversität vorzunehmen. Auch hier lassen sich genetische Methoden anwenden.



Abb. 2. Meist werden im Naturschutz strukturelle Massnahmen als Vernetzungselemente geplant (z. B. Trittsteinbiotope, links, oder Biodiversitätsförderflächen, rechts). Die Frage, ob diese tatsächlich zu einem funktionellen Verbund führen, bleibt aber oft unbeantwortet (Fotos: André Stapfer).

2 Workflow Amphibiennachweis mit eDNA

2.1 Fragestellung

Mit genetischen Methoden lassen sich Arten bestimmen. Dieser Ansatz ist bestens aus den Medien bekannt, wenn es darum geht, herauszufinden, ob ein Schaf durch einen Wolf oder einen Hund gerissen wurde. Im Speichel an den Wunden des gerissenen Schafs finden sich DNA-Spuren des Raubtieres und dementsprechend kann aus dem Speichel auch dessen Identität bestimmt werden.

DNA findet man auch im Wasser eines Gewässers. Mit Hilfe dieser eDNA aus Wasserproben lässt sich beispielsweise ermitteln, welche Amphibien in einem Gewässer vorkommen. Hierzu verwendet man ein kleines Stück DNA, dessen Sequenz (Abfolge der DNA-Bausteine) innerhalb einer Amphibienart konstant ist, sich zwischen den verschiedenen Amphibienarten aber unterscheidet. Man verwendet also einen genetischen Barcode für jede Art. Will man alle Amphibienarten in einer Wasserprobe auf einmal unterscheiden spricht man von Metabarcoding. Anwendungen von eDNA und Metabarcoding sind heute in der Forschung weit verbreitet und werden zunehmend auch in der Naturschutzpraxis bei der Artbestimmung und beim Artenmonitoring verwendet (KELLY *et al.* 2014; DEINER *et al.* 2017; TABERLET *et al.* 2018). Zum Beispiel akzeptiert das Schweizer Datenzentrum für Amphibien und Reptilien info fauna karch (www.karch.ch/) Amphibiennachweise mittels eDNA und speist diese in seine Datenbank ein.

Mit Erhebungen der eDNA können – wie dies auch für traditionelle Erhebungsmethoden zutrifft – die vorhandenen Amphibienarten in einem Gewässer nicht mit 100% Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden. Neben einer gewissen Fehlerrate bei der Laboranalytik (welche zu Problemen bei der Unterscheidung von nah verwandten Arten führen kann), spielt vor allem DNA-Kontamination bei der Probenahme im Feld eine Rolle und muss darum vermieden werden. Untersuchungen der eDNA werden idealerweise als Ergänzung zu traditionellen Erhebungen von Amphibien im Feld durch Fachleute verwendet. Mit eDNA kann dabei Zusatzinformation gewonnen werden, insbesondere zu versteckt lebenden, schwierig nachzuweisenden oder im Feld morphologisch nicht bestimmbar Amphibienarten (Kapitel 2.3; Abb. 3).

Kapitel 2.2 gibt zuerst einen Überblick dazu, welche Amphibienarten der Schweiz im Workflow eDNA Amphibien des entwickelten Werkzeugkastens nachgewiesen werden können. Kapitel 2.3 beschreibt anschliessend die Vor- und Nachteile von eDNA.

Kapitel 2.4 gibt einen kurzen Überblick zum genauen Ablauf des Workflows eDNA Amphibien und Kapitel 2.5 beschreibt anschliessend detailliert wie die Probenahme erfolgt, welches Material dafür nötig ist und wie das Probenahmedesign erstellt wird. Kapitel 2.6 zeigt für Interessierte einige Details zu den Laboranalysen der eDNA Proben auf.

Im Kapitel 2.7 werden dann eine Interpretationshilfe für die Resultate der Laboranalysen und auch ein konkretes Beispiel für die Resultate gegeben. Schliesslich werden im Kapitel 2.8 die anfallenden Kosten kurz dargestellt.



Abb. 3. Der Kammolch (*Triturus cristatus*; links) ist eine versteckt lebende, schwierig nachzuweisende Amphibienart. Wasserfrösche (*Pelophylax* sp.; rechts) können im Feld nicht bis auf Artniveau bestimmt werden (Fotos: Andreas Meyer).

2.2 Welche Amphibienarten können in Weihern mit eDNA nachgewiesen werden?

Welche Arten können mit dem hier vorgeschlagenen Workflow eDNA Amphibien erfasst werden? Es sind dies die in Weihern, Teichen, Tümpeln und temporären Gewässern laichenden und/oder lebenden Amphibienarten der Schweiz (Tab. 1). Für grössere Gewässer wie Kleinseen ist die Methode hingegen nur bedingt geeignet.

Tab. 1. Weiherbewohnende Amphibienarten, die mittels des Workflows eDNA Amphibien nachgewiesen werden können.

Deutscher Name	Lateinischer Name
Bergmolch	<i>Ichthyosaura alpestris</i>
Fadenmolch	<i>Lissotriton helveticus</i>
Teichmolch	<i>Lissotriton vulgaris</i>
Kammolch	<i>Triturus cristatus</i>
Italienischer Kammolch	<i>Triturus carnifex</i>
Geburtshelferkröte	<i>Alytes obstetricans</i>
Gelbbauchunke	<i>Bombina variegata</i>
Erdkröte	<i>Bufo bufo</i>
Kreuzkröte	<i>Epidalea calamita</i>
Laubfrosch	<i>Hyla arborea</i>
Italienischer Laubfrosch*	<i>Hyla intermedia*</i>
Wasserfrosch	<i>Pelophylax bedriagae</i>
Wasserfrosch	<i>Pelophylax bergeri</i>
Wasserfrosch-Komplex	<i>Pelophylax kurtmuelleri</i> und <i>P. ridibundus</i>
Wasserfrosch	<i>Pelophylax esculentus</i> und <i>P. lessonae</i>
Springfrosch	<i>Rana dalmatina</i>
Italienischer Springfrosch	<i>Rana latastei</i>
Grasfrosch	<i>Rana temporaria</i>

* Diese Art wurde taxonomisch neu bearbeitet. Die in der Schweiz heimische Form heisst *Hyla perrini*.

2.2.1 Spezialfall Wasserfrösche

Die Wasserfrösche der Gattung *Pelophylax* sind alle nahe verwandt. Daher ist die genetische Artbestimmung nicht in allen Fällen möglich. Die genetische Artbestimmung funktioniert bei *P. bergeri* und *P. bedriagae*. Ausserdem können zwei weitere Gruppen unterschieden werden. Eine Gruppe besteht aus *P. esculentus* und *P. lessonae*. Wenn diese Gruppe nachgewiesen wird, dann kommen im Weiher entweder *P. esculentus*, *P. lessonae* oder beide Arten vor. Die zweite Gruppe besteht aus den nicht einheimischen Arten *P. kurtmuelleri* und *P. ridibundus*. Wenn diese Gruppe nachgewiesen wird, dann kommen am Ort entweder *P. kurtmuelleri*, *P. ridibundus* oder beide Arten vor.

eDNA Resultate zu Wasserfröschen müssen vorsichtig interpretiert werden, denn die Genetik der Wasserfrösche ist komplex. Diese Komplexität hat mindestens zwei Gründe. Erstens, Wasserfrösche bilden sogenannte hybridogenetische Komplexe, in denen in der Regel eine Elternart mit einer Hybridform zusammenlebt. In der Schweiz sind dies natürlicherweise *P. lessonae* als Elternart und *P. esculentus* als Hybrid. Letzterer ist aus einer Hybridisierung von *P. lessonae* x *P. ridibundus* entstanden. Beim Wasserfrosch-Komplex wurde mehrfach festgestellt, dass die DNA der Mitochondrien (einem Zellbestandteil mit eigener DNA), von einer Art zur andern «gesprungen» ist. So kommt beispielsweise *P. ridibundus* mit der mitochondrialen DNA von *P. lessonae* vor (das ist der häufigste Fall; der umgekehrte Fall ist selten). Ein solcher *P. lessonae* würde als *P. ridibundus*

nachgewiesen. Zweitens gibt es bei den Wasserfröschen zahlreiche invasive Arten, welche untereinander und mit den einheimischen Arten Hybriden bilden. Hybride kann man mit eDNA nicht unterscheiden (LEUENBERGER *et al.* 2014).

Trotz dieser Komplikationen sind Aussagen zu den Wasserfröschen möglich. Wenn eDNA der invasiven Arten festgestellt wird, dann kann man davon ausgehen, dass invasive Arten vorkommen. Im besten Fall wären es nicht invasive Arten sondern «nur» *P. lessonae* mit der mitochondrialen DNA von *P. ridibundus*. Wenn man jedoch nur die eDNA der einheimischen Arten findet (*P. lessonae* und *P. esculentus*), so dürften das reine, einheimische Populationen sein. Allerdings kann es sein, dass auch invasive *P. ridibundus* mit mitochondrialer DNA von *P. lessonae* vorkommen. Ein Beispiel kann die Interpretation veranschaulichen: Es werden 25 Amphibienlaichgebiete beprobt. In 18 wird eDNA der invasiven *Pelophylax*-Arten und in sieben nur die eDNA der einheimischen Arten gefunden. In diesem Fall kann man davon ausgehen, dass einheimische Arten in maximal sieben Amphibienlaichgewässern vorkommen.

2.2.2 Spezialfall Alpen- und Feuersalamander

Mit der im Workflow eDNA Amphibien entwickelten Methodik kann auch der Feuersalamander (*Salamandra salamandra*) nachgewiesen werden. Im Rahmen der Entwicklung des Werkzeugkastens Naturschutzgenetik wurden nur Weiher untersucht, in denen der Feuersalamander nicht zu erwarten war. Der Feuersalamander wurde an den untersuchten Orten denn auch nicht mit eDNA nachgewiesen. Der Feuersalamander setzt seine Larven in Bächen ab und lebt sonst im Wald. Fließgewässer müssen für eDNA Untersuchungen jedoch anders beprobt werden als Weiher und Teiche. Aus diesen zwei Gründen kann nichts darüber ausgesagt werden, wie gut der Feuersalamander mit dem entwickelten Workflow eDNA Amphibien nachgewiesen werden kann. Ausserdem kann der Workflow eDNA Amphibien nicht zum Nachweis des landbewohnenden Alpensalamanders (*S. atra*) verwendet werden.

2.3 Mehrwert von eDNA Untersuchungen

Mit eDNA kann die Anwesenheit von Amphibien in den Weihern, Teichen und Tümpeln eines Amphibienlaichgebiets nachgewiesen werden. HerpetologInnen können Amphibien auch mit traditionellen Methoden nachweisen. Was also bringt eDNA im Vergleich zu herkömmlichen Methoden? Ist eDNA besser als Suchen, Verhören, Keschern oder Fallen stellen?

Eine mögliche Kenngrösse, um die Effizienz einer Methode zu beschreiben, ist die Nachweiswahrscheinlichkeit (KÉRY 2008). Diese ist definiert als die Wahrscheinlichkeit, eine Art zu finden, wenn man einen Ort besucht, an welchem die Art vorkommt. Vergleicht man die Nachweiswahrscheinlichkeiten verschiedener Methoden, so sieht man, dass eDNA oft gleich gut abschneidet wie andere Methoden (BALINT *et al.* 2018). Es gibt aber auch Studien, welche zeigen, dass eDNA deutlich besser als herkömmliche Methoden funktioniert (SMART *et al.* 2015; VALENTINI *et al.* 2016). Je mehr Wasserproben pro Gewässer und je umfangreicher die Laborarbeit, desto besser schneidet eDNA in der Regel ab.

eDNA hat Vor- und Nachteile. Nachfolgend werden diese diskutiert und daraus Hinweise für die Feldarbeit abgeleitet. eDNA kann bei einem Projekt als einzige Methode zum Einsatz kommen. Am besten wird eDNA aber in Kombination mit herkömmlichen Methoden eingesetzt, zum Beispiel wenn man Wasserfrösche (*Pelophylax* sp.) genau bestimmen will (Kapitel 2.2.1), wenn man kaum nachweisbare Kamm- (*Triturus cristatus*) oder Teichmolche (*Lissotriton vulgaris*) nachweisen muss oder wenn man Präsenz/Absenz-Nachweise mit Zählungen kombinieren will. Will man hingegen nur den Laubfrosch (*Hyla arborea*) erfassen, lohnt sich eine eDNA Untersuchung kaum.

- Bei einem Artnachweis mit eDNA wird die Art nicht gesehen oder gefangen, sondern «nur» durch den Nachweis ihrer DNA als im Amphibienlaichgebiet vorkommend bestimmt. Es ist für viele Amphibienfachleute eine neue Situation, aufgrund von eDNA Daten Entscheide zu fällen. Hat man einen Kammmolch (*T. cristatus*) gefangen und

fotografiert, so sind alle davon überzeugt, dass die Art an einem Ort vorkommt. Hat man den Kammmolch nur mit eDNA nachgewiesen, so sind gemäss unserer Erfahrungen viele Fachpersonen skeptisch. Man kann das Sprichwort «lieber den Spatz in der Hand als die Taube auf dem Dach» abändern zu «lieber das Amphib im Keschel als den Nachweis aus dem Labor».

- Einer der wichtigsten Nachteile von eDNA ist, dass mit eDNA die Häufigkeit (Abundanz) einer Art nicht bestimmt werden kann. Mit herkömmlichen Methoden sind Zählungen näherungsweise möglich.
- Mit eDNA kann nur das Vorkommen (Präsenz) einer Art, nicht aber das Vorkommen unterschiedlicher Lebensstadien nachgewiesen werden. Man kann mit eDNA nicht sagen, ob in einem Gewässer nur adulte Individuen vorkommen oder ob sich die Art im Gewässer auch fortpflanzt und Kaulquappen im Weiher zu finden sind.
- eDNA kann Arten unterscheiden, die morphologisch nur schwer zu unterscheiden sind. Das sind die Wasserfrösche der Gattung *Pelophylax* und die Kammmolche (insbesondere wo der Italienische Kammmolch *T. carnifex* invasiv auftritt).
- eDNA kann Arten nachweisen, die mit herkömmlichen Methoden kaum nachweisbar sind. Ein Beispiel sind Teichmolche (*L. vulgaris*) in grösseren Gewässern. Es gibt Fälle, wo diese Art nur mit hohem Aufwand (Aufstellen von Fangzäunen) nachgewiesen werden konnte.
- Die eDNA-Mengen im Wasser sinken schnell, wenn eine Art das Gewässer verlässt. eDNA bleibt im Wasser etwa zwei Wochen lang nachweisbar. Eine Art kann also nur dann im Gewässer nachgewiesen werden, wenn sie darin aktuell präsent ist oder dies gerade noch war. Umgekehrt ist es so, dass sich die eDNA-Konzentrationen im Wasser rasch aufbauen, wenn eine Art ins Gewässer kommt.
- Spezialisierte Arten können unter Umständen mit eDNA nur schwer nachweisbar sein. Beispiele sind Gelbbauchunke (*Bombina variegata*) und Kreuzkröte (*Epidalea calamita*). Diese Arten bewohnen meist nur kleine Tümpel. In grösseren Amphibienlaichgebieten mit mehreren solchen Gewässern kann es sein, dass letztere bei der Probenahme übersehen werden.
- Kleine Populationen sind mit eDNA – wie auch mit herkömmlichen Methoden – nur schwer nachzuweisen. Hierzu gibt es allerdings noch kaum wissenschaftliche Studien.
- Vor allem terrestrisch lebende Arten sind mit eDNA nur schwer nachzuweisen. Ein Beispiel ist der Laubfrosch (*H. arborea*). Die Männchen befinden sich nur zum Rufen im Wasser und es sind meist nur wenige Kaulquappen mit geringer Biomasse im Gewässer.
- Ein Nachteil von eDNA ist, dass sie Hybride der in Tabelle 1 aufgeführten Arten nicht unterscheiden kann. Man kann also keine Hybride zwischen Kammmolchen (*T. cristatus*) und Italienischen Kammmolchen (*T. carnifex*) nachweisen. Hybride werden aufgrund der im Workflow eDNA Amphibien verwendeten DNA-Sequenz (mitochondriale DNA) der Elternart mütterlicherseits zugeordnet (zur Unterscheidung wäre die Analyse von DNA aus dem Zellkern nötig). Allerdings können solche Hybride auch morphologisch kaum unterschieden werden.
- Feldarbeit für eDNA kann tagsüber oder nachts gemacht werden. Das Sammeln von Wasserproben in grösseren Amphibienlaichgebieten kann etwa gleich viel Zeit beanspruchen wie die Suche nach Amphibien. Da man aber tagsüber arbeiten kann, ist das Zeitfenster für Feldarbeit grösser als bei herkömmlichen Methoden, bei denen vor allem nachts gearbeitet wird.
- Wird Feldarbeit tagsüber gemacht, kann die Qualität des Lebensraums besser beurteilt werden als bei Feldarbeit während der Nacht. Ist dies bei einer Untersuchung wichtig, kann eine eDNA Untersuchung von Vorteil sein.
- Es ist jeweils dann am meisten eDNA im Wasser, wenn die Arten am aktivsten sind. Die Wahl des richtigen Zeitpunkts ist – wie auch bei herkömmlichen Methoden – entscheidend. Wenn man beispielsweise Ende Juni Proben sammelt, dann zeigt eDNA möglicherweise nicht mehr viele Arten an. Fachwissen ist also auch bei eDNA Untersuchungen gefragt.
- Es ist anzunehmen, wurde aber noch nicht getestet, dass eDNA weniger wetterabhängig ist als herkömmliche Methoden. Man kann Amphibien in einem Gewässer

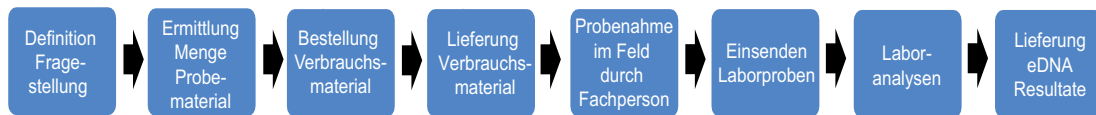


Abb. 4. Einzelne Schritte des Workflows eDNA Amphibien.

auch nachweisen, wenn die Tiere wenig aktiv sind. Starker Niederschlag kann allerdings die eDNA-Konzentration im Gewässer verringern.

- Die eigentliche Probennahme für eDNA erfordert im Prinzip wenig Fachwissen. Da eDNA in kleinen stehenden Gewässern nicht homogen verteilt ist, braucht es aber Fachwissen dazu, wo man Wasserproben am besten nimmt. Es ist jedoch nicht notwendig, dass man alle Arten und Lebensstadien selber bestimmen kann (z.B. Kaulquappen). Somit könnte eDNA auch für ein Monitoring mit Freiwilligen geeignet sein. Allerdings ist das Sammeln von Wasserproben für eine eDNA Untersuchung für Freiwillige unattraktiv: letztere wollen Tiere sehen!
- Mit traditionellen Methoden bekommt man den Artnachweis im Feld sofort. Bei eDNA muss man die Proben ins Labor schicken und erhält die Nachweise erst einige Wochen später. Meist ist dies kein Problem, aber wenn man schnell Daten braucht – etwa in einer laufenden UVP – ist eine eDNA Untersuchung nicht geeignet.

Beim Artenmanagement gewinnt der Aspekt des Tierschutzes zunehmend an Bedeutung. Hier ist eDNA vorteilhaft, da Tiere weder gefangen noch gestört werden.

Weitere Informationen finden sich in SCHMIDT und URSENBACHER (2015) sowie SCHMIDT und GRÜNIG (2017).

2.4 Ablauf einer eDNA Untersuchung für Amphibien

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte des Workflows eDNA behandelt (Abb. 4). Ebenfalls wird das dabei benötigte Material und die Kosten vorgestellt. Der Workflow eDNA Amphibien wurde in den Jahren 2016 und 2017 an rund 80 Gewässern in verschiedenen Kantonen der Deutschschweiz erprobt und optimiert.

2.5 Probenahme und Probenahmedesign

Das für die Beprobung der Gewässer benötigte Material umfasst neben anderem die mit QR-Barcodes versehenen Proberöhrchen, in welche die Wasserprobe zugegeben wird. Detaillierte Instruktionen, wie die Feldbeprobung ausgeführt wird, inklusive einer Video-Dokumentation, finden sich unter <http://arnal.ch/naturschutzgenetik/methoden.htm>.

Das benötigte Material ist in Tabelle 2 und in Abbildung 5 dargestellt. Zuerst werden die Proberöhrchen beziehungsweise Tubes vorbereitet.

- Mit Puffer befüllte Tubes mit QR-Codes beschriften und mit Klebeband abkleben.
- Vorbereitung Sampling Submission Form (ein standardisiertes Formular) und Probenahmedesign (siehe unten).

Die eigentliche Probenahme erfolgt folgendermassen.

- Plastik-Handschuhe anziehen.
- Offenes Tube in Probenahmewerkzeug einspannen. Tube an den von einer Fachperson bestimmten Probenahmestellen in etwa 1 m Entfernung vom Ufer und in einer Tiefe von etwa 10 cm mit Wasser vollständig füllen.
- Gewässerprobe (50 ml Teichwasser) in PET-Flasche umfüllen.
- Obige Schritte gemäss Probedesign repetieren.
- PET-Flasche mit den gesammelten Gewässerproben pro Amphibienlaichgebiet verschliessen und kräftig schütteln.
- Tubes (mit vorabgefülltem Puffer und QR-Code) mit jeweils 15 ml der gemischten Wasserprobe füllen (dies ist die Probe, die ans Labor geschickt wird = Laborprobe).

- Tubes in Rack in der Kühlbox aufbewahren.
- Sampling Submission Form ausfüllen.
- Bei Bedarf Probenahmestellen auf Karte oder Luftbild einzeichnen.
- Bei Bedarf Gewässer mit Fotos dokumentieren.
- Nach jedem Gewässer wird das Probenahme-Werkzeug mit Leitungswasser gereinigt und mit Papiertüchern getrocknet um allfällige DNA-Spuren auf dem Werkzeug zu entfernen.
- Nach jedem Gewässer Desinfektion der Stiefel und aller Werkzeuge mit Alkohol oder Virkon um eine allfällige Verbreitung des Chytridpilzes (*Batrachochytrium dendrobatidis*) oder anderer Krankheitserreger zu verhindern.

Die Lagerung der Proben und der Versand sind anschliessend beschrieben.

- Einsenden der Laborproben innerhalb eines Tages ins Labor (ungekühlt).
- Allenfalls Lagerung für mehrere Tage im Tiefkühlschrank bei -20°C .
- Sampling Submission Form ausgedruckt mit den Laborproben mitschicken (und zusätzlich per E-Mail).

Es wird empfohlen, sämtliche Feldarbeiten mit Handschuhen durchzuführen, um die Verunreinigung der Proben mit menschlicher DNA zu minimieren. Sämtliche Einweg-Materialien (Tubes, PET-Flaschen, Handschuhe, Plastiksäcke) müssen nach jedem Gewässer gewechselt und entsorgt werden.

Tab. 2. Benötigtes Material für die Probenahme von eDNA im Feld.

Material	Anzahl
Plastikhandschuhe	1 Paar pro Gewässer
Probenahme-Röhrchen, 50 ml Tubes	Je nach Probenahmedesign
PET-Flasche (0,5 bis 1l)	1 pro Gewässer
Standard Puffer = 33,5 ml purissimum Ethanol + 1,5 ml Natriumacetat (3 M, pH 5,2)	35 ml pro Tube
Tubes mit Reserve-Puffer	1–2 pro Gewässer
Racks	Je nach Anzahl Tubes
Vorgedruckte QR-Codes zur Beschriftung der Tubes	1 pro Probe bzw. Tube
Sampling Submission Form	1 pro Gewässer
Probenahmewerkzeug	1
Kühlbox mit Kühlelementen	1
Durchsichtiges Klebeband	1
Wasserfester Filzstift	1
Sprühflasche mit 70 % Alkohol oder Virkon (Antec International)	1
Papiertücher	Vorrätig
Leitungswasser für Reinigung Probenahmewerkzeug	1 l pro Gewässer
5 l Eimer (bei grossen Gewässern)	1
Plastiksäcke zum Auskleiden des Eimers	1 pro Gewässer
Fotokamera	1

Beim Probenahmedesign wird zwischen zwei Fällen unterschieden: Einzelgewässern, also Gewässern ohne weitere Gewässer im engeren Umkreis (eine Laborprobe pro Einzelgewässer; Kapitel 2.5.1), und Gewässer-Komplexen (Kapitel 2.5.2). Bei letzterem handelt es sich um einen Komplex mehrerer Gewässer im engeren Umkreis (eine Laborprobe für alle Gewässer als Ganzes).

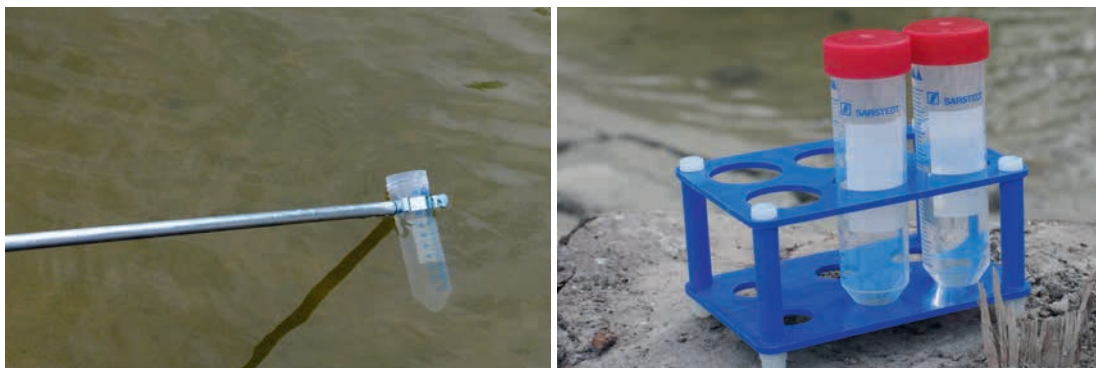


Abb. 5. Probenahmewerkzeug mit Probenahmeröhrchen (50 ml; links). Rack mit Probenahmeröhrchen (rechts).

2.5.1 Einzelgewässer

Bei Einzelgewässern werden an mehreren Stellen pro Gewässer Wasserproben entnommen. Die Anzahl der Probenahmestellen wird vorgängig (Luftbild) oder vor Ort von einer Fachperson bestimmt. Die in Tabelle 3 gegebenen Angaben dienen als Richtwerte. Es gilt diejenigen Ufer- und Gewässerbereiche zu beproben, wo sich Amphibien am ehesten aufhalten (unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Lebensräume von Schwanz- und Froschlurchen). Sämtliche Wasserproben zu 50 ml pro Gewässer werden in einer neuen PET-Flasche gemischt, und die Tubes mit 15 ml gemischtem Wasser und 35 ml Puffer gefüllt. Grundsätzlich wird empfohlen, drei Proben pro Gewässer (und Begehung) im Labor analysieren zu lassen (Abb. 6).

Tab. 3. Richtwerte für die Anzahl Probenahmestellen, an welchen Wasserproben genommen werden pro Gewässer bei verschiedenen Gewässergrössen.

Gewässergrösse	Anzahl Probenahmestellen
< 50 m ²	3–5
50–500 m ²	6–10
> 500 m ²	11–20

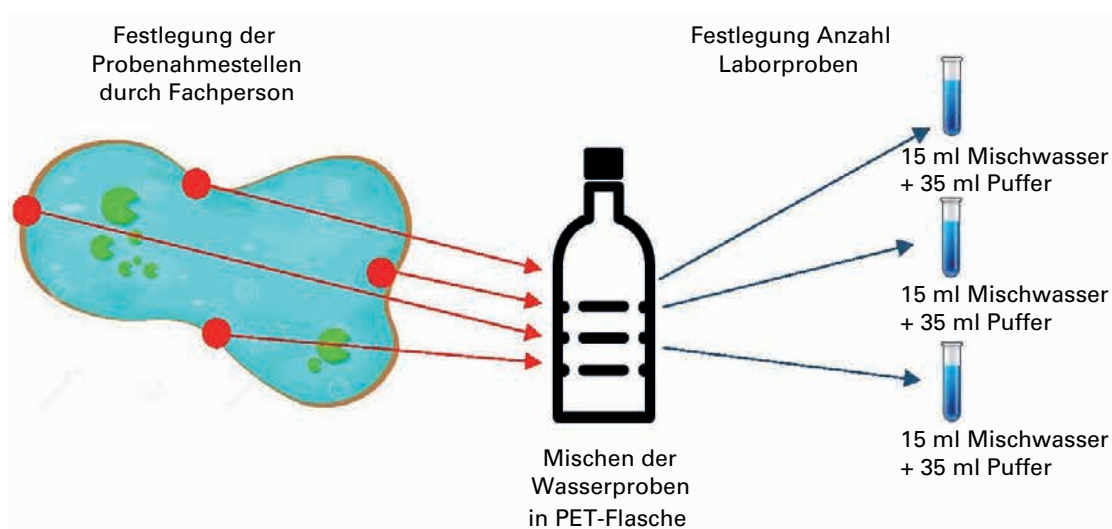


Abb. 6. Probenahme eines Einzelgewässers, im Beispiel mit vier Probenahmestellen (rot) und drei Laborproben.

Auch der saisonale Zeitpunkt der Probenahmen hängt von der Fragestellung ab. Sind insbesondere Daten zu Früh- und Spätläichern gewünscht, werden zwei Begehungen mit Probenahmen empfohlen (erste Hälfte April und Mitte Mai). Werden hingegen nur allgemeine Aussagen zu den Amphibien-Arten in einem Gewässer benötigt, genügt eine Begehung (z. B. Anfang Mai, also zum Zeitpunkt höchster Wahrscheinlichkeit allgemeiner Amphibienaktivität im Gewässer).

2.5.2 Gewässer-Komplex

Ist ein möglichst vollständiges Bild der vorkommenden Amphibienarten erforderlich, sollten sämtliche Gewässer im Gebiet in die Untersuchungen einbezogen werden. Die Festlegung der Probenahmestellen, die Anzahl Wasser- und Laborproben sowie die Anzahl der Begehungen erfolgt analog zu Einzelgewässern (Kapitel 2.5.1). Bei einem Gewässer-Komplex können entweder Laborproben für jedes Gewässer einzeln oder Laborproben für den gesamten Komplex gesammelt werden. Wird jedes Gewässer einzeln beprobt, sind diese wie Einzelgewässer zu behandeln. Zwischen der Beprobung der Gewässer müssen darum sämtliche Einweg-Materialien ausgetauscht und das Probewerkzeug gereinigt werden, um Kontamination zu vermeiden.

Wird der Gewässer-Komplex als Ganzes beprobt, werden die Wasserproben aus den unterschiedlichen Gewässern an von Fachpersonen bestimmten Probenahmestellen gesammelt (Abb. 7). Die Wasserproben werden danach in einer PET-Flasche gemischt und in die Tubes für die Laborproben abgefüllt. Bei grösseren Gewässerkomplexen mit mehr als 20 Probenahmestellen werden die Wasserproben in mehreren PET-Flaschen gesammelt. Danach werden diese in einem 5 l Eimer, ausgekleidet mit einem Plastiksack, gemischt und in die Tubes für die Laborproben abgefüllt (Kasten 2; Abb. 8).

2.5.3 Spezialfälle

Je nach Fragestellung können andere Vorgehensweisen zielführend sein. Ein Beispiel ist die separate Beprobung von temporären und ständig wasserführenden Gewässern in einem Gewässer-Komplex (Kasten 2). Die beiden Gruppen werden wie je ein Gewässer-Komplex behandelt. Zwischen der Beprobung der Gewässer der beiden Typen müssen sämtliche Einweg-Materialien ausgetauscht und das Probewerkzeug gereinigt werden, um Kontamination zu vermeiden.

Ein anderes Beispiel ist die Beprobung nur jener Gewässer, welche potentiellen Lebensraum einer bestimmten Amphibien-Zielart darstellen.

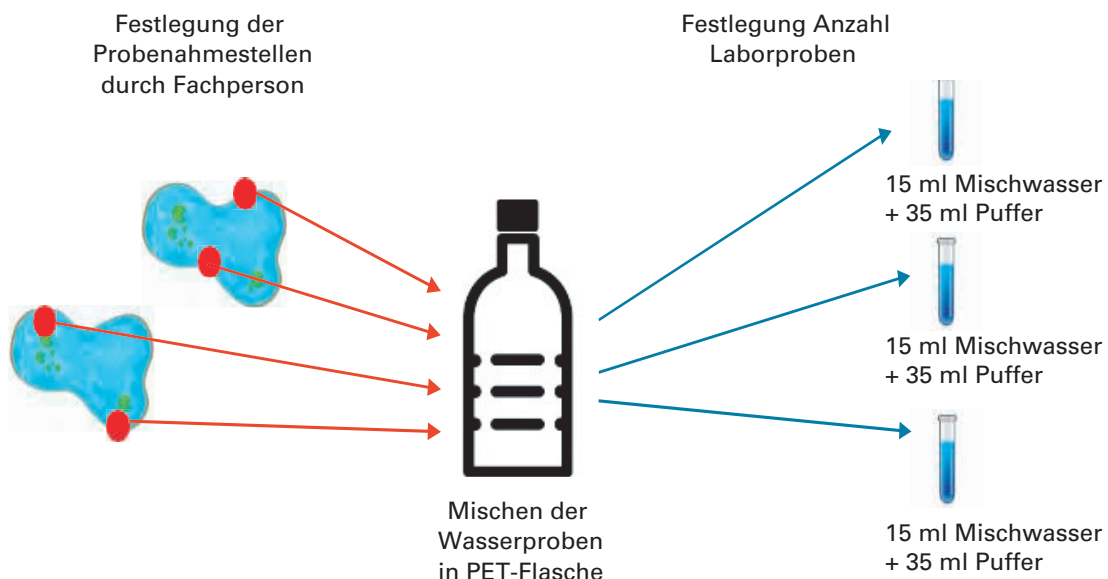


Abb. 7. Probenahme in einem Gewässer-Komplex, im Beispiel mit je zwei Probenahmestellen pro Gewässer (rot) und drei Laborproben.

Kasten 2. Beispiel einer Spezialbeprobung

Bei einem Gewässer-Komplex mit mehreren temporären und ständig wasserführenden Gewässern wird mit Felderhebungen und eDNA das vollständige Artenspektrum der Amphibien erfasst. Für die Erhebungen werden zwei herkömmliche Felderhebungen zu zwei saisonalen Zeitpunkten (April: Frühlaicher; Mitte Mai: Spätlaicher) und jeweils gleichzeitig eDNA-Erhebungen durchgeführt. Bei jeder der beiden eDNA-Erhebungen werden aus der Mischprobe aller Gewässer je drei Laborproben (Tubes) ins Labor geschickt. Für die Auswertung stehen – zusätzlich zu den Resultaten der herkömmlichen Felderhebung – sechs Datensätze (2x3 Laborproben) der eDNA-Erhebungen zur Verfügung.

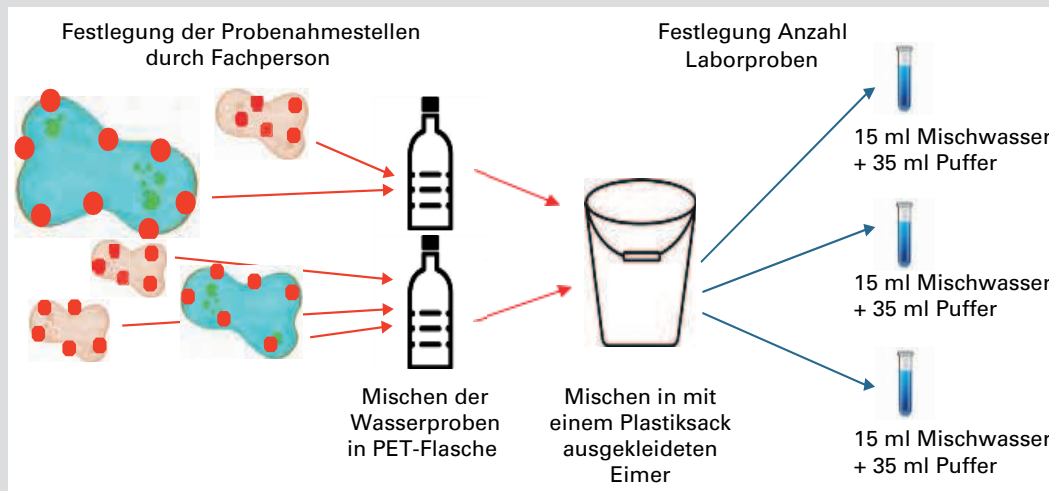


Abb. 8. Probenahme (rot, 20 Probenahmestellen) von temporären (rosa) und stets wasserführenden Gewässern (hellblau) in einem Gewässer-Komplex mit drei Laborproben.

2.6 Labormethoden

Für Metabarcoding muss ein Abschnitt der DNA gefunden werden, welcher zwischen Arten möglichst verschieden, aber innerhalb von Arten nicht verschieden ist. Jede Art ist so durch eine (oder doch ganz wenige) DNA-Sequenzen eindeutig bestimmt. Sequenziert man diesen Abschnitt aus einer DNA-Probe unbekannter Herkunft, kann durch den Vergleich mit einer Referenzdatenbank, in der die entsprechenden DNA-Sequenzen aller Amphibienarten der Schweiz vorliegen, bestimmt werden, um welche Amphibienart es sich bei der gefundenen DNA-Sequenz handelt. Man muss also einerseits einen DNA-Abschnitt finden, der Amphibienarten unterscheiden kann und eine entsprechende Referenzdatenbank aufbauen und andererseits muss die Labormethode etabliert und optimiert werden.

2.6.1 Auswahl der DNA-Sequenz für das Metabarcoding

Basierend auf bereits vorhandenen Daten von Genomen (Erbgut) von Mitochondrien (mtDNA) von Amphibienarten der Schweiz wurde ein geeigneter Abschnitt in der DNA der Mitochondrien bestimmt, welcher sich für Metabarcoding eignet. Der variable Abschnitt musste möglichst kurz (<100 bp) und die flankierenden Bereiche der Sequenz so konserviert sein, dass ein universell einsetzbarer genetischer Primer für die Vervielfältigung des DNA Abschnitts entwickelt werden konnte. Zudem wurde darauf geachtet, dass dieser Primer nicht mit anderen, bereits vorhandenen und für kommerzielle Anwendungen patentierten Primern übereinstimmte. Es wurde in der 16S rRNA der mtDNA ein solcher Abschnitt gefunden, welcher genügend Variabilität zwischen den Amphibienarten der Schweiz und angrenzender Gebiete aufweist (Abb. 9).

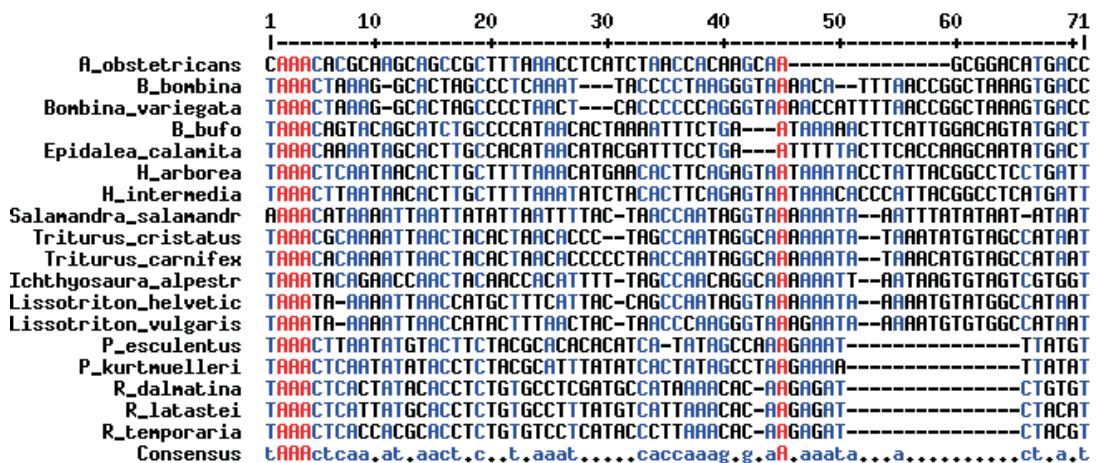


Abb. 9. Ausgewählten Abschnitts der 16S rRNA für ausgewählte Amphibienarten.

2.6.2 Aufbau der Referenzdatenbank

Der ausgewählte Abschnitt der 16S rRNA wurde mittels PCR (polymerase chain reaction) an verschiedenen Proben von allen Amphibienarten der Schweiz getestet. Das Material hierzu wurde von verschiedenen Organisationen zu Verfügung gestellt (info species karch, Universität Lausanne, Universität Zürich, WSL). Daraus wurde – ergänzt durch entsprechende Sequenzen aus der Literatur – für den Werkzeugkasten eine Referenzdatenbank der DNA Sequenzen des ausgewählten Abschnitts aller Amphibienarten der Schweiz (inklusive des Tessins) aufgebaut. Diese Referenzdatenbank wurde und wird laufend ergänzt.

2.6.3 Etablierung und Optimierung der Labormethode

Nach der Fällung der eDNA und einer Zentrifugation erfolgt die DNA Isolation aus den Wasserproben mit einer Säulen-basierter Methode. Die Vervielfältigung des 16S rRNA Abschnitts erfolgt mit Primern in den konservierten Regionen, welche den DNA-Bar-code einschliessen (Microsynth und ecogenics 2018). Da in den Wasserproben verbreitet menschliche DNA gefunden wurde, wurden die Primer so optimiert, dass sie praktisch keine menschliche DNA, dafür aber spezifischer Amphibien DNA in der PCR vervielfältigen.

Um falsch negative Resultate im Labor zu erkennen, welche durch Hemmung der PCR verursacht werden (fehlende PCR Vervielfältigung vorhandener DNA einer Amphibienart), wird der PCR eine künstliche DNA in wenigen Molekülen beigegeben. Diese künstliche DNA zeigt an, ob die Vervielfältigung der DNA in der PCR prinzipiell erfolgreich war oder nicht. Die entwickelte Methode ist sehr sensitiv: Zehn DNA Moleküle werden in einer PCR bereits bei mehr als 50 % der Proben erkannt.

Zur Validierung der Methode wurden künstliche Gemische aus der DNA verschiedener Amphibienarten in unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt und so die Nachweisgrenze der etablierten Methode getestet. Dabei zeigte sich, dass in der Regel alle Amphibienarten gut nachgewiesen werden, aber auch, dass die Nachweis-Wahrscheinlichkeit bei sehr geringer Anzahl der Moleküle abnimmt, was auf zufällige Effekte bei der PCR hinweist.

2.6.4 Darstellung der Resultate

Die Resultate der Laboranalysen bestehen aus der Aussage, ob eine Art in einem Gewässer sicher nachgewiesen oder ob es sich nur um einen Nachweis-Verdacht handelt, welcher weiter verifiziert werden müsste (Kapitel 2.7). Die Aussage, ob ein Nachweis sicher ist, wird mittels eines statistischen Verfahrens ermittelt, welches im Rahmen des Werkzeugkastens Naturschutzgenetik entwickelt und getestet wurde. Dabei ging es vor allem darum, falsch positive Resultate auszuschliessen.

2.7 Interpretation der Resultate

Dieses Kapitel zeigt, wie die Resultate aus dem Labor im Workflow eDNA Amphibien interpretiert werden. Eine Interpretationshilfe für die Praxis ist unter <http://arnal.ch/naturschutzgenetik/methoden.htm> verfügbar. Mit eDNA wird grundsätzlich die Anwesenheit von Amphibien an einem Ort nachgewiesen.

Zuerst gilt es die Grenzen der Untersuchung zu bedenken. Wenn man beispielsweise Wasserproben mehrerer Gewässer aus einem Amphibienlaichgebiet gemischt hat, so können nur Aussagen für das ganze Gebiet gemacht werden. Hat man hingegen Proben für einzelne Gewässer im Amphibienlaichgebiet gesammelt, so kann man für jedes dieser Gewässer eine Aussage machen. Wenn man Proben im März sammelt, sind «späte» Arten wie die Gelbbauchunke (*Bombina variegata*) oder der Laubfrosch (*Hyla arborea*) noch nicht aktiv und diese werden somit nicht erfasst. Ein Nicht-Nachweis einer Art muss also in Hinsicht auf das Probenahmedesign erfolgen.

2.7.1 Nachweis von Amphibien-Vorkommen

Es werden mehrere Laborproben pro Gewässer ans Labor eingeschickt (Abb. 6, 7, 8). Eine Art kann in keiner, einer, zwei oder drei usw. dieser Laborproben genetisch nachgewiesen werden. Die Interpretation der Resultate erfolgt folgendermassen:

- Mittels statistischer Verfahren wird für jede Art ein Schwellenwert der Anzahl vervielfältigter DNA Moleküle ermittelt, ab welchem ein sicherer Nachweis besteht (2 im Kasten 3).
- Erreicht eine Art diesen Schwellenwert nicht, so besteht nur ein Verdacht für ihr Vorkommen im Gewässer (1 im Kasten 3).
- Wurde für eine Art in allen Laborproben eines Gewässers gar keine DNA vervielfältigt, gilt sie als nicht nachgewiesen (0 im Kasten 3).

Wenn es für eine Art in einem Gewässer sowohl sichere als auch unsichere Nachweise gibt, dann gilt der Artnachweis als sicher. Wenn eine Art nur unsicher nachgewiesen wurde, dann bedarf es zusätzlicher Untersuchungen (mit eDNA oder herkömmlichen Methoden), falls ein sicherer Nachweis wichtig ist. Ob dem so ist, hängt von der Fragestellung ab. Wenn beispielsweise der Artnachweis im Rahmen eines Artenförderungsprojekts erfolgt, dann kann man den Entscheid treffen, die Art nur dort zu fördern, wo sie sicher nachgewiesen wurde. Oder der Artnachweis erfolgt für eine UVP: In diesem Fall muss der Artnachweis sicher sein.

Es ist möglich, dass eine Art trotz mehrerer Laborproben nicht gefunden wird. Wenn das Ergebnis dreimal «0» ist, so bedeutet dies nicht zwingend, dass die Art im Amphibienlaichgebiet nicht vorkommt, sie wurde nur mittels eDNA nicht gefunden (wie dies für jede Methode der Arterfassung gilt). Nehmen wir an, dass eine Art in zwei von drei Laborproben aus einem Gewässer sicher gefunden wurde: Die Art kommt dort sicher vor. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Art in einer Laborprobe nicht zu finden ist, ist also $1/3$. Die theoretische Wahrscheinlichkeit die Art bei drei Laborproben nicht zu finden ist $(1 - [1/3])^3 = 0,29$ (KÉRY 2008). Man kann davon ausgehen, dass die Art in 29% der Gewässer, in denen sie vorkommt, bei drei Laborproben mit eDNA nicht nachgewiesen wird.

Ein konkretes Beispiel für die Interpretation der eDNA Resultate wird in Kasten 3 gegeben.

2.8 Kosten

Die Kosten für eine Untersuchung der eDNA bestehen aus den Kosten für die Probenahme, das Probenahmematerial und die eigentlichen Laboranalysen. Die Kosten (inklusive Material für Probenahme) können unter www.naturschutzgenetik.ch eingesehen werden. Im Falle, dass die Proben im Rahmen einer jährlichen kollektiven Analyse (durch ecogenics) bearbeitet werden, ist momentan mit Laborkosten von etwa CHF 220.– (ohne MwSt) pro Probe zu rechnen. Die Kosten für das Probenahmematerial hängen wesentlich von der Anzahl Proben ab, welche gesammelt werden.

Kasten 3. Beispiel einer Standardauswertung des Workflows eDNA Amphibien

Jede Laborprobe entspricht einer Spalte in Abbildung 10, hier also sieben Laborproben aus einem Gewässer. Die Probenbezeichnung erfolgt mittels des QR-Codes sowie, wenn in der Sample Submission Form angegeben, mit dem dazugehörigen Probennamen.

Im ersten Block werden alle Amphibienarten, welche mittels des Workflows eDNA Amphibien erfasst werden können, aufgelistet. Im Falle, dass gewisse Arten nicht eindeutig bestimmt werden können, werden diese Arten zu einem Komplex zusammengefasst (z. B. *P. esculentus* und *P. lessonae*). Der Unterschied in der DNA-Sequenz zwischen *P. bergeri* und dem *P. esculentus lessonae* Komplex ist besonders klein. Aus diesem Grund müssen diese beiden taxonomischen Gruppen vorsichtig interpretiert werden. Im Gegensatz dazu sind die anderen *Pelophylax*-Arten beziehungsweise andere Artengruppen klar unterscheidbar.

Wenn kein Nachweis einer Art vorliegt, wird dies mit 0 ausgewiesen. Alle Nachweise mit einer 2 sind sicher, Nachweise mit einer 1 sind unsicher und müssten, falls der entsprechende Artnachweis wichtig ist, verifiziert werden.

Die Menge an Amphibien-DNA in einer Wasserprobe beeinflusst den Nachweis der Amphibien. Bei sehr geringen Amphibien-DNA Konzentrationen wird erwartet, dass Nachweise schwierig sind. Die Klassifizierung der Amphibien-DNA Konzentrationen basiert auf der Gesamtanzahl vervielfältigter Moleküle pro Laborprobe und dem Nachweis künstlicher DNA (Kapitel 2.6.3). Proben mit tiefen Amphibien-DNA Konzentrationen sind vorsichtig zu interpretieren.

Im zweiten Block werden weitere Arten ausgewiesen, welche mit eDNA ermittelt wurden. Die taxonomische Zuordnung ist weniger genau, und die Daten können nur als Hinweis auf das Vorkommen einer Art oder Gattung interpretiert werden. So ist nicht zu erwarten, dass der Lachs (*Salmo salar*) in Laichgewässern von Amphibien vorkommt, aber die genetisch nah verwandte Forelle (*S. trutta*) durchaus.

		Probe_01	Probe_02	Probe_03	Probe_04	Probe_05	Probe_06	Probe_07
Ordnung	Art	110901	110902	110903	110904	110905	110906	110907
Anura	Alytes_obstetricans	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Bombina_bombina	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Bombina_variegata	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Bufo_bufo	0	0	2	2	2	0	0
Anura	Epidalea_calamita	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Hyla_arborea	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Hyla_intermedia	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Pelophylax_bedrigae	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Pelophylax_bergeri	0	0	0	0	0	0	2
Anura	Pelophylax_esculentus_lessonae	0	0	0	0	0	0	1
Anura	Pelophylax_kurtmuelleri_ridibundus_complex	2	0	0	0	0	0	0
Anura	Rana_dalmatina	2	2	2	0	0	0	1
Anura	Rana_latastei	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Rana_temporaria	2	2	2	2	2	2	1
Caudata	Ichthyosaura_alpestris	0	0	1	2	1	0	0
Caudata	Lissotriton_helveticus	0	0	0	0	0	0	0
Caudata	Lissotriton_vulgaris	0	0	0	0	0	0	0
Caudata	Salamandra_salamandra	0	0	0	0	0	0	0
Caudata	Triturus_carnifex	0	0	0	0	0	0	0
Caudata	Triturus_cristatus	0	0	0	0	0	0	0
Amphibien-DNA-Gehalt		hoch	hoch	hoch	mittel	tief	mittel	tief
Weitere detektierte Arten								
Anseriformes	Anas_platyrhynchos	0	2	0	0	0	0	0
Galliformes	Gallus_gallus	1	2	0	0	2	2	1
Passeriformes	Turdus_merula	2	0	0	0	0	0	0
Primates	Homo_sapiens	0	0	0	0	1	2	0
Salmoniformes	Salmo_salar	0	0	2	1	2	2	0

Abb. 10. Beispiel der Resultate einer eDNA Analyse zum Amphibiennachweis.

3 Workflow Verbund

3.1 Fragestellung

Zerschnittene Lebensräume und ihre Populationen miteinander zu vernetzen und in einen Verbund (Abb. 11) zu integrieren ist ein wichtiges Naturschutzziel (ökologische Infrastruktur). Allerdings ist es schwierig festzustellen, ob Populationen miteinander in Verbindung stehen und Individuen und damit auch Gene austauschen. Meist werden im Naturschutz strukturelle Massnahmen als Vernetzungselemente geplant (z. B. Trittsteinhabitate, Hecken, Biodiversitätsförderflächen). Die Frage, ob diese strukturellen Elemente auch tatsächlich zu funktioneller Vernetzung führen, bleibt meist unbeantwortet, da entsprechende Untersuchungen aufwendig sind. Bei der Untersuchung, ob Populationen miteinander vernetzt und in einem Verbund integriert sind, liefert die Naturschutzgenetik einen wesentlichen Beitrag. Zurzeit ist dies die einzige Methode, die allgemein und für (fast) alle Organismengruppen mit vertretbarem Aufwand anwendbar ist, um Vernetzung oder Isolation auf Landschaftsebene festzustellen.

Ziel des Workflows Verbund des Werkzeugkastens Naturschutzgenetik ist es, für die Naturschutzpraxis (Behörden, Planungsbüros, NGOs usw.) eine einfache Anleitung für den standardmässigen Einsatz von genetischen Methoden für die Erfassung der bestehenden Vernetzung oder Isolation beziehungsweise für die Erfolgskontrolle bei bereits getroffenen Vernetzungsmassnahmen anzubieten. Mit dem Workflow Verbund können angewandte Fragestellungen wie die folgenden beantwortet werden:

- Sind die Populationen einer für den Naturschutz wichtigen Art vernetzt (Artenschutz)?
- Sind die Populationen einer typischen Art eines im Fokus des Naturschutzes stehenden Lebensraums (z. B. Trockenwiesen, Siedlungsflächen usw.) verbunden (Lebensraumverbund)?
- Sind räumlich getrennte Populationen isoliert oder in einem Verbund integriert (Metapopulation)?
- Welche Populationen sind Quell-, welche Empfängerpopulationen im Austausch von Individuen zwischen Populationen (Bedeutung von Populationen im Verbund)?
- Welche Landschaftselemente fördern oder hindern den Austausch von Individuen zwischen Populationen (ökologische Infrastruktur)?
- Ist die Anlage zusätzlicher Vernetzungs- oder Verbundelemente angezeigt?
- Führen neu geschaffene Vernetzungs- oder Verbundelemente wie Trittsteinbiotope zu einem Verbund von Populationen einer für den Naturschutz wichtigen Art (Erfolgskontrolle)?

Der Workflow Verbund ist entsprechend der einzelnen Schritte einer genetischen Untersuchung zum Verbund oder zur Vernetzung aufgebaut. Kapitel 3.2 beschreibt zuerst, welche Arten sich für die Untersuchung des Verbunds von Populationen und Lebensräumen eignen. Kapitel 3.3 zeigt die Prinzipien, die es bei der Auswahl der zu untersuchenden und zu beprobenden Populationen zu beachten gilt. Hier wird gezeigt, wie viele Populationen untersucht und von wie vielen Individuen genetische Proben genommen werden müssen. Das Verständnis dieses Schritts ist für die Naturschutzpraxis wichtig (Abb. 12).

Kapitel 3.4 zeigt, welche genetischen Proben man von welchen Organismengruppen sammelt. Auch dieser Schritt ist für die Naturschutzpraxis wichtig. Kapitel 3.5 erklärt in knapper Weise die verwendeten Laboranalysen. Die Laboranalysen sind für die Naturschutzpraxis im Detail nicht relevant, interessierte Personen finden hier die nötigen technischen Informationen in kurzer Form.

Kapitel 3.6 zeigt, welche statistischen Standardauswertungen wie und mit welchen Computerprogrammen durchgeführt werden. Es definiert auch die daraus entstehenden Produkte. Die Details zu den statistischen Standardauswertungen stehen für die Naturschutzpraxis nicht im Vordergrund. Interessierte Personen finden hier die nötigen Informationen. Kapitel 3.7 bietet eine Interpretationshilfe dafür, wie die Resultate der statistischen Standardauswertungen im Naturschutz interpretiert werden. Das Kapitel enthält auch ein konkretes Beispiel. Es ist wichtig, dass NaturschutzpraktikerInnen verstehen, was diese statistischen Standardauswertungen aussagen und wie die Resultate zu interpretieren sind. Schliesslich weist Kapitel 3.8 die Kosten kurz aus.



Abb. 11. Vernetzungsmassnahmen (links) im Wildtierkorridor Suret (Kanton AG; rechts; Fotos: Martin C. Fischer).

Workflow Verbund

Probenahmedesign: grundlegende Prinzipien zur Auswahl der Populationen und der Anzahl beprobter Individuen pro Population (Kapitel 3.3)



Probenahme: genetische Probenahme im Feld; welches Probenmaterial wird wie gesammelt? (Kapitel 3.4)



Labormethode: technische Details zu den genetischen Laboranalysen (Kapitel 3.5)



Statistische Auswertungen: technische Details zu den statistischen Standardauswertungen (Kapitel 3.6)



Interpretation: welche statistischen Standardauswertungen werden durchgeführt, was sagen sie aus und wie werden die Resultate interpretiert? (Kapitel 3.7)

Abb. 12. Workflow Verbund und dessen fünf Schritte (Kapitel 3.3–3.7). Blau: für die Naturschutzpraxis wichtige Schritte, die NaturschutzpraktikerInnen verstehen müssen; grau: für die Naturschutzpraxis nicht wichtige Schritte, die den genetischen Spezialisten überlassen sind.

3.2 Welche Arten eignen sich?

Die Naturschutzpraxis ist oft daran interessiert, ob für den Naturschutz wichtige Lebensräume miteinander verbunden sind. Genetisch lässt sich das erfassen, indem man untersucht, ob die Populationen typischer Arten dieser Lebensräume miteinander verbunden sind oder nicht. Diese typischen Arten sollten möglichst in ihrem Vorkommen auf einen Lebensraumtyp beschränkt, nicht zu häufig, aber auch nicht zu selten, nicht allzu mobil (Vögel, aber auch Säugetiere eignen sich in der Regel weniger) und im Feld einfach zu bestimmen sein. Tabelle 4 enthält eine Liste mit Vorschlägen für solche Arten (neben vielen anderen), die für die Untersuchung des Lebensraumverbunds geeignet sind. Diese Tabelle beruht auf verschiedenen Dokumenten wie der Arten Umweltziele Landwirtschaft (UZL; WALTER *et al.* 2012), den Ziel- und Leitarten im Kanton Zug (PFISTER 2004), der Liste der besonders empfohlenen Leitarten für die naturschutzrelevanten Lebensräume des Kantons Luzern (Umwelt und Energie Kanton Luzern 2007), den Lebensräumen der Schweiz (DELARZE und GONSETH 2015), dem nationalen ökologischen Netzwerk REN (BERTHOUD *et al.* 2004), den national prioritären Arten (BAFU 2011), den Leitarten für das Landwirtschaftsgebiet der Vogelwarte Sempach (GRAF *et al.* 2009) oder dem Vernetzungskonzept des Kantons Aargau (Departement Finanzen und Ressourcen, Department Bau, Verkehr und Umwelt Kanton Aargau 2015).

3.3 Probenahmedesign

Arten besiedeln verschiedene Lebensräume, bewegen sich durch verschiedene Landschaftsstrukturen, meiden andere und wandern über verschiedene geografische Distanzen hinweg. Ihre Lebensräume sind in verschiedenen Landschaften verschieden häufig, anders angeordnet und verschieden gross. Für jede genetisch untersuchte Art in einer bestimmten Landschaft muss daher das Probenahmedesign der Populationen neu festgelegt werden. Es gibt hierfür kein allgemein gültiges Probenahmedesign, aber es gibt allgemein anwendbare Prinzipien, um zu bestimmen, wie viele Populationen an welchen Orten für genetische Analysen zum Verbund untersucht werden sollen.

3.3.1 Was ist eine Population?

Im Workflow Verbund werden als Population alle Individuen einer Art in einem räumlich klar umrissenen Lebensraum definiert. Es sind dies also die Individuen einer Art an einem Ort. Beispiele sind etwa die Kammmolche (*Triturus cristatus*) in einem Teich oder einer Gruppe von nahe liegenden Teichen, die Schlingnattern (*Coronella austriaca*) entlang eines Bahndamms, die Pyramidenorchideen (*Anacamptis pyramidalis*) einer Trockenwiese, die Turmschnecken (*Turritellidae*) eines Felsgebiets, die Eichenzipfelfalter (*Favonius quercus*) eines Eichenwaldes, die Birkhühner (*Tetrao tetrix*) in einem Bergwald oder die Edelkrebse (*Astacus astacus*) in einem bestimmten Bach. Diese Definition ist pragmatisch, aber zweckmässig. (Für den Spezialfall, wenn Individuen keiner Population zugeordnet werden können, siehe Kapitel 3.3.4).

Tab. 4. Lebensräume und Auswahl von typischen Arten aus unterschiedlichen Organismengruppen für eine genetische Untersuchung des Lebensraumverbunds. MS: Mikrosatelliten; 0 = nicht vorhanden; 1 = vorhanden; Stand 2019). * In der Regel verursachen nicht-diploide (polyploide) Chromosomensätze wenig Probleme bei der Mikrostelliten-Analyse.

Lebensraum	Gruppe	Art	MS*
Ufer von Seen und Weihern	Libellen	Frühe Adonislibelle (<i>Pyrrhosoma nymphula</i>)	0
		Winterlibelle (<i>Sympecma fusca</i>)	0
	Heuschrecken	Grosse Goldschrecke (<i>Chrysochraon dispar</i>)	0
	Amphibien	Erdkröte (<i>Bufo bufo</i>)	1
	Reptilien	Ringelnatter (<i>Natrix natrix</i> s.l.)	1
	Pflanzen	Gelbe Schwertlilie (<i>Iris pseudocorus</i>)	1
		Schnabelsegge (<i>Carex rostrata</i>)	1
Kleingewässer, Tümpel	Libellen	Südlicher Blaupfeil (<i>Orthetrum brunneum</i>)	0
	Heuschrecken	Langflügelige Schwertschrecke (<i>Conocephalus fuscus</i>)	1
	Amphibien	Kreuzkröte (<i>Epidalea calamita</i>)	1
		Gelbbauchunke (<i>Bombina variegata</i>)	1
	Pflanzen	Kröten-Binse (<i>Juncus bufonius</i>)	0
Ufer von Flüssen und Bächen	Libellen	Gebänderte Prachtlibelle (<i>Calopteryx splendens</i>)	1
	Heuschrecken	Grosse Goldschrecke (<i>Chrysochraon dispar</i>)	0
	Amphibien	Feuersalamander (<i>Salamandra salamandra</i>)	1
	Krebse	Dohlenkrebs (<i>Austropotamobius pallipes</i>)	1
Flachmoore, Rieder	Tagfalter	Mädesüss-Perlmutterfalter (<i>Brenthis ino</i>)	1
		Silberscheckenfalter (<i>Melitaea diamina</i>)	0
	Libellen	Sumpf-Heidelibelle (<i>Sympetrum depressiusculum</i>)	0
		Heuschrecken	Sumpfgrippe (<i>Pteronemobius heydenii</i>)
	Langflügelige Schwertschrecke (<i>Conocephalus fuscus</i>)		1
	Grosse Goldschrecke (<i>Chrysochraon dispar</i>)		0
	Sumpfschrecke (<i>Stethophyma grossum</i>)		1
	Sumpfgrashüpfer (<i>Chorthippus montanus</i>)		1
	Pflanzen	Schwalbenwurzenzian (<i>Gentiana asclepiadea</i>)	0
		Grosser Wiesenknopf (<i>Sanguisorba officinalis</i>)	1
		Davalls-Segge (<i>Carex davalliana</i>)	0
		Teufelsabbiss (<i>Succisa pratensis</i>)	1
Hochmoore	Tagfalter	Hochmoor-Perlmutterfalter (<i>Boloria aquilonaris</i>)	1
	Reptilien	Mooreidechse (<i>Zootoca vivipara</i>)	1
	Pflanzen	Scheidiges Wollgras (<i>Eriophorum vaginatum</i>)	0
		Rundblättriger Sonnentau (<i>Drosera rotundifolia</i>)	0
		Gemeine Moosbeere (<i>Vaccinium oxycoccos</i>)	1
		Rauschbeere (<i>Vaccinium uliginosum</i>)	1
Trockenwiesen und -weiden	Tagfalter	Schachbrettfalter (<i>Melanargia galathea</i>)	1
		Sechsfleck-Widderchen (<i>Zygaena filipendulae</i>)	0
		Malvendickkopffalter (<i>Carcharodus alceae</i>)	0
		Kleines Fünffleck-Widderchen (<i>Zygaena viciae</i>)	0
	Heuschrecken	Feldgrille (<i>Gryllus campestris</i>)	1
		Heidegrashüpfer (<i>Stenobothrus lineatus</i>)	0
	Wildbienen	Veränderliche Hummel (<i>Bombus humilis</i>)	1
	Reptilien	Zauneidechse (<i>Lacerta agilis</i>)	1
	Pflanzen	Esparsette (<i>Onobrychis viciifolia</i>)	1
		Kleiner Wiesenknopf (<i>Sanguisorba minor</i>)	0
		Pyramiden-Orchidee (<i>Anacamptis pyramidalis</i>)	0
		Schnecken	Zebraschnecke (<i>Zebrina detrita</i>)
	Alpine Hochstauden	Pflanzen	Rundblättriger Steinbrech (<i>Saxifraga rotundifolia</i>)
Hoher Rittersporn (<i>Delphinium elatum</i>)			0
Schwarzer Apollo (<i>Parnassius mnemosyne</i>)			1

Lebensraum	Gruppe	Art	MS*
Gebirgs-Magerrasen	Tagfalter	Silbergrüner Bläuling (<i>Polyommatus coridon</i>)	1
		Grosser Perlmutterfalter (<i>Argynnis aglaja</i>)	0
		Graubindiger Mohrenfalter (<i>Erebia aethiops</i>)	0
	Wildbienen	Distelhummel (<i>Bombus soroeensis</i>)	0
	Pflanzen	Schwarzes Männertreu (<i>Nigritella nigra</i>)	0
		Alpenaster (<i>Aster alpinus</i>)	0
Extensive Fettwiesen und -weiden	Tagfalter	Schachbrettfalter (<i>Melanargia galathea</i>)	1
	Heuschrecken	Feldgrille (<i>Gryllus campestris</i>)	1
	Pflanzen	Wiesensalbei (<i>Salvia pratensis</i>)	0
		Wiesen-Glockenblume (<i>Campanula patula</i>)	0
Krautsäume	Tagfalter	Aurora (<i>Anthocharis cardamines</i>)	0
	Heuschrecken	Gemeine Sichelschrecke (<i>Phaneroptera falcata</i>)	0
	Reptilien	Blindschleiche (<i>Anguis fragilis fragilis</i>)	1
Hecken, Feldgehölze	Tagfalter	Aurora (<i>Anthocharis cardamines</i>)	0
	Heuschrecken	Gemeine Sichelschrecke (<i>Phaneroptera falcata</i>)	0
	Käfer	Gefleckter Schmalbockkäfer (<i>Leptura maculata</i>)	0
	Wildbienen	Gewöhnliche Löcherbiene (<i>Heriades truncorum</i>)	0
		Veränderliche Hummel (<i>Bombus humilis</i>)	1
	Reptilien	Blindschleiche (<i>Anguis fragilis fragilis</i>)	1
Waldränder	Heuschrecken	Gemeine Sichelschrecke (<i>Phaneroptera falcata</i>)	0
		Gemeiner Schmalbockkäfer (<i>Leptura maculata</i>)	0
	Wildbienen	Gewöhnliche Löcherbiene (<i>Heriades truncorum</i>)	0
		Veränderliche Hummel (<i>Bombus humilis</i>)	1
	Reptilien	Blindschleiche (<i>Anguis fragilis fragilis</i>)	1
		Bergeidechse (<i>Zootoca vivipara</i>)	1
Orchideen-Buchenwald	Pflanzen	Ästige Graslilie (<i>Anthericum ramosum</i>)	0
		Bergeidechse (<i>Zootoca vivipara</i>)	1
	Reptilien	Zauneidechse (<i>Lacerta agilis</i>)	1
		Schmalblättriges Waldvögelein (<i>Cephalanthera longifolia</i>)	0
Pfeifengras-Föhrenwald	Tagfalter	Graubindiger Mohrenfalter (<i>Erebia aethiops</i>)	0
	Reptilien	Bergeidechse (<i>Zootoca vivipara</i>)	1
		Zauneidechse (<i>Lacerta agilis</i>)	1
		Bergaster (<i>Aster amellus</i>)	1
	Pflanzen	Niedrige Segge (<i>Carex humilis</i>)	0
		Türkenbund (<i>Lilium martagon</i>)	0
		Immenblatt (<i>Melittis melissophyllum</i>)	1
Rebberge, Obstgärten	Heuschrecken	Feldgrille (<i>Gryllus campestris</i>)	1
	Pflanzen	Weinberglauch (<i>Allium vineale</i>)	0
		Gewöhnliche Löcherbiene (<i>Heriades truncorum</i>)	0
	Wildbienen	Gemeine Holzbienne (<i>Xylocopa violacea</i>)	0
		Veränderliche Hummel (<i>Bombus humilis</i>)	1
Siedlungsraum	Tagfalter	Malvendickkopffalter (<i>Carcharodus alceae</i>)	0
	Wildbienen	Glänzende Natterkopf-Mauerbiene (<i>Osmia adunca</i>)	0
		Gewöhnliche Löcherbiene (<i>Heriades truncorum</i>)	0
	Reptilien	Blindschleiche (<i>Anguis fragilis fragilis</i>)	1
		Zauneidechse (<i>Lacerta agilis</i>)	1
Bunt- und Rotationsbrachen	Wildbienen	Glänzende Natterkopf-Mauerbiene (<i>Osmia adunca</i>)	0
		Gewöhnliche Löcherbiene (<i>Heriades truncorum</i>)	0
	Spinne	Wespenpinne (<i>Argiope bruennichi</i>)	1
Kiesgruben	Wildbienen	Glänzende Natterkopf-Mauerbiene (<i>Osmia adunca</i>)	0
	Amphibien	Kreuzkröte (<i>Epidalea calamita</i>)	1

3.3.2 Prinzipien für die Auswahl und Anzahl untersuchter Populationen

Zur Festlegung, welche Populationen einer Art in einer Landschaft untersucht werden sollen, sind Kenntnisse zu deren Verbreitung und Vorkommen im Untersuchungsgebiet nötig. Mit Hilfe der folgenden fünf Prinzipien werden die zu untersuchenden Populationen festgelegt. Die fünf Prinzipien sind gleichzeitig anzuwenden. Sie werden mit sechs Graphiken erläutert (Abb. 13–18) und in Kapitel 3.7 mit einem konkreten Beispiel aus der Schweiz illustriert.

Prinzip: Richtige räumliche Skala. Die richtige räumliche Skala zu wählen, ist wichtig. Es macht wenig Sinn zwei Populationen, die klar innerhalb der regelmässigen Ausbreitungsdistanz von Arten liegen, genetisch auf Verbund zu prüfen. Es sei denn, diese sind durch ein zerschneidendes Landschaftselement voneinander getrennt (Abb. 13) oder man will explizit diese unzerschnittene Situation zum Vergleich mit einer zerschnittenen Situation erfassen (Abb. 15). Für viele Organismengruppen lassen sich ungefähre Ausbreitungsdistanzen aus der Literatur oder aufgrund von Expertenwissen angeben. Allzu grosse, unrealistische Distanzen zwischen untersuchten Populationen machen ebenfalls keinen Sinn (ausser man will explizit seltene Ausbreitung über grosse Distanzen nachweisen). Untersucht man Populationen innerhalb einer Landschaft – also der üblichen Planungsebene für Verbund in der Naturschutzpraxis – liegt man in der Regel auf der richtigen räumlichen Skala. Ausserdem müssen Populationen in verschiedenen Distanzen zueinander untersucht werden (siehe unten).

Prinzip: Einbezug von Barrieren oder Vernetzungselementen. Ist die Frage, ob eine Siedlung Populationen zerschneidet oder ein Wildtierkorridor zur Vernetzung von Populationen beiträgt, so müssen Populationen gesammelt werden, die von diesen Landschaftsstrukturen direkt beeinflusst werden. Es werden also beispielsweise Populationen auf verschiedenen Seiten einer Siedlung oder an den Enden eines Vernetzungskorridors untersucht (Abb. 13, 14, 17).

Prinzip: Vergleichspopulationen. Will man genetisch erfassen, ob eine Autobahn Populationen zerschneidet, Trittsteinbiotope wirken, Korridore Lebensräume verbinden oder eine Landschaft mit vielen naturnahen Elementen vernetzt ist, so müssen diese Situationen mit den gegenteiligen Situationen verglichen werden. Somit sollten durch eine Autobahn zerschnittene Populationen mit solchen verglichen werden, die nicht von Autobahnen zerschnitten sind (Abb. 13). Das gleiche gilt für Vergleiche von allgemein zerschnittenen Populationen mit nicht zerschnittenen Populationen (Abb. 15), von mit Trittsteinen oder Korridoren verbundenen mit nicht verbundenen Populationen (Abb. 16, 17) oder für Landschaften mit vielen mit solchen mit wenigen Lebensraumflächen, wie etwa Biodiversitätsförderflächen (Abb. 18). Dies lässt sich einfach ins Probenahmedesign integrieren, indem etwa zerschnittene Populationen entlang einer Autobahn mit unzerschnittenen Populationen im Hinterland der Autobahn verglichen werden (Abb. 13). Tatsächlich ist es in aller Regel kein Problem, Vergleichspopulationen im oder nahe beim Untersuchungsraum zu finden.

Prinzip: Geografische Distanz. Eine grundsätzliche ökologische Annahme ist, dass der Austausch von Individuen (und damit von Genen) zwischen Populationen mit zunehmender geografischer Distanz kleiner wird (Isolation durch die Distanz). Nahe gelegene Populationen haben in der Regel viel Austausch, während geografisch weiter entfernte Populationen nur geringen oder keinen Austausch zeigen. Diesen Einfluss der geografischen Distanz muss man bei der Interpretation der genetischen Daten im Auge behalten. Deshalb ist es wichtig, im Probenahmedesign Populationen in verschiedenen geografischen Distanzen zueinander zu berücksichtigen. Meist ergibt sich das aus den Vorkommen einer Art fast von selbst.

Prinzip: Anzahl untersuchte Populationen. Es müssen nicht alle in der untersuchten Landschaft vorhandenen Populationen untersucht werden, sondern nur so viele, dass die Fragestellung mit jeweils genügend Vergleichen (siehe oben) beantwortet werden kann. In Abbildung 13 kann man mit acht untersuchten Populationen jede Population nördlich der Autobahn mit jeder südlich der Autobahn vergleichen. Dies ergibt 16 mutmasslich zerschnittene Vergleichspaare. Ausserdem kann man auf beiden Seiten der Autobahn Vergleiche zwischen unzerschnittenen Populationen machen. Dies ergibt $2 \times 6 = 12$ unzerschnittene Vergleichspaare.

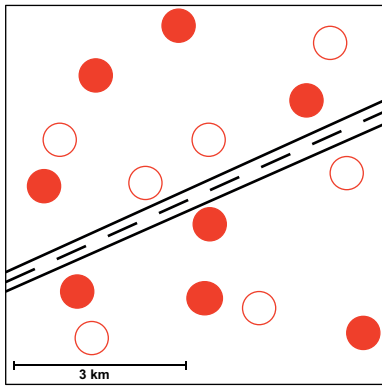


Abb. 13. Einbezug eines zerschneidenden Landschaftselements ins Probenahmedesign. Eine Landschaft ist durch eine eingezäunte Autobahn zerschnitten. Untersucht wird ein kleines Säugetier (z. B. Siebenschläfer, *Glis glis*), das sich kaum über mehr als 3 km ausbreitet. Es werden Populationen auf beiden Seiten der Autobahn untersucht, sowohl nahe der Autobahn als auch im Hinterland. Ausserdem wird darauf geachtet, dass sich die beprobten Populationen in verschiedenen geografischen Distanzen zueinander befinden. Der mutmassliche Zerschneidungseffekt der Autobahn wird durch den Vergleich von Populationen über die Autobahn hinweg (zerschnitten) mit Populationen auf der gleichen Seite der Autobahn (unter Berücksichtigung der geografischen Distanz) zwischen den Populationen erfasst. Hier werden acht Populationen untersucht (gefüllte rote Kreise), es würden auch sechs genügen. Es sind weitere Populationen in der Landschaft vorhanden (leere rote Kreise), die aber nicht genetisch untersucht werden.

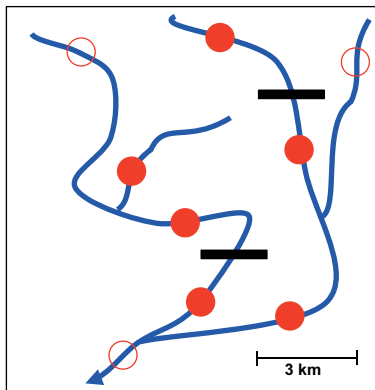


Abb. 14. Einbezug eines zerschneidenden Landschaftselements in einem Fließgewässersystem ins Probenahmedesign. Das Fließgewässersystem (blau) ist durch Schwellen (schwarze Balken) zerschnitten. Untersucht wird eine Fischart, die sich über viele Kilometer ausbreiten kann. Es werden Populationen oberhalb und unterhalb der Schwellen und zusätzlich nicht durch Schwellen getrennte Populationen untersucht. Ausserdem wird darauf geachtet, dass sich die Populationen in verschiedenen geografischen Distanzen entlang des Gewässersystems befinden. Der mutmassliche Zerschneidungseffekt der Schwellen wird durch den Vergleich von Populationen unterhalb und oberhalb der Schwellen (zerschnitten) mit nicht durch Schwellen getrennten Populationen (unter Berücksichtigung der geografischen Distanzen entlang des Gewässersystems) erfasst. Es werden sechs Populationen untersucht (gefüllte rote Kreise). Es sind weitere Populationen im Gewässersystem vorhanden (leere rote Kreise), die aber nicht genetisch untersucht werden.

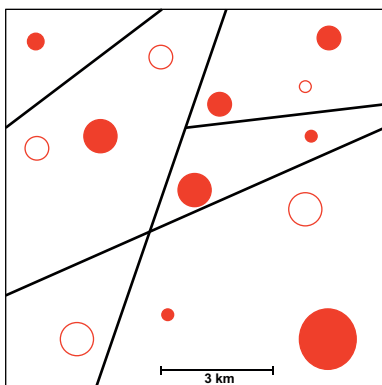


Abb. 15. Einbezug vieler zerschneidender Elemente ins Probenahmedesign. Eine Landschaft ist durch verschiedenste Elemente zerschnitten (schwarze Linien). Untersucht wird ein flugfähiges Insekt (z. B. ein Tagfalter), das sich bis etwa 3 km ausbreiten kann. Es werden Populationen in den verschiedenen Landschaftsfragmenten untersucht. Dabei wird darauf geachtet, dass in einigen Landschaftsfragmenten zwei Populationen untersucht werden (unzerschnittene Situation). Die Populationsgrösse (Grösse der roten Kreise) spielt für die genetische Analyse der Zerschneidung keine (direkte) Rolle. Ausserdem wird darauf geachtet, dass sich die beprobten Populationen in verschiedenen geografischen Distanzen zueinander befinden. Der mutmassliche Zerschneidungseffekt wird durch den Vergleich der genetischen Zusammensetzung von Populationen innerhalb eines Landschaftsfragments (unzerschnitten) mit der genetischen Zusammensetzung von Populationen in verschiedenen Landschaftsfragmenten (zerschnitten; unter Berücksichtigung der geografischen Distanz) erfasst. Es muss nicht in jedem Landschaftsfragment eine Population untersucht werden. Im Beispiel werden acht Populationen untersucht (gefüllte rote Kreise). Es sind weitere Populationen in der Landschaft vorhanden (leere rote Kreise), die aber nicht genetisch untersucht werden.

In der Regel genügen sechs bis zehn untersuchte Populationen zur Beantwortung angewandter Fragestellungen zum Verbund. Trotzdem gilt, dass je vollständiger die Populationen im Untersuchungsgebiet beprobt werden, desto besser sind die genetischen Resultate. Dies ist besonders wichtig, wenn aktuelle Wanderer (first generation migrants) bestimmt werden sollen (Kapitel 3.6.4, 3.7.4).

Ist das Probenahmedesign – das heisst welche Populationen an welchem Ort zu welchem Zeitpunkt (optimale Aktivität der zu untersuchenden Art) – bestimmt, werden die Namen der zu untersuchenden Populationen und die Mittelpunkt-Koordinaten jeder Po-

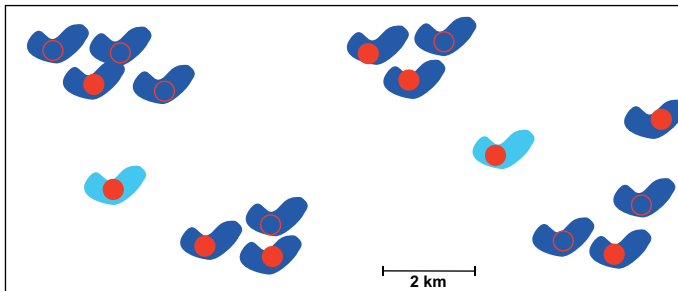


Abb. 16. Einbezug von Trittsteinbiotopen als Vernetzungselemente ins Probenahmedesign. In einer Landschaft liegen vier Gebiete mit mehreren Teichen (dunkelblau) und Vorkommen eines Frosches. Frösche wandern regelmässig rund 2 km. Um einige dieser Teichgruppen miteinander zu vernetzen wurden Trittsteinbiotope (hellblau) angelegt, die vom Frosch besiedelt wurden. Führt dies zu einem Verbund im ganzen Teichsystem? Es werden einige (gefüllte rote Kreise), aber nicht alle Populationen (leere rote Kreise) in den verschiedenen Teichgruppen und in den Trittsteinbiotopen untersucht. Dabei wird darauf geachtet, dass sich sowohl mit Trittsteinen verbundene als auch nicht verbundene Teichgruppen im Probenahmedesign befinden. In gewissen Teichgruppen werden zwei Teiche beprobt (unzerschnittene Situation), in anderen nicht. Ausserdem wird darauf geachtet, dass sich die Populationen in verschiedenen geografischen Distanzen befinden. Der Vergleich von Populationen innerhalb eines Teichsystems zeigt, wie gut diese Teiche untereinander vernetzt sind. Ein Vergleich zwischen mit Trittsteinen und nicht mit Trittsteinen verbundenen Teichsystemen weist den allfälligen Vernetzungseffekt der Trittsteine (unter Berücksichtigung der geografischen Distanz) nach. (In den Trittsteinbiotopen selbst muss nicht unbedingt gesammelt werden, um deren Vernetzungseffekt genetisch nachzuweisen.)

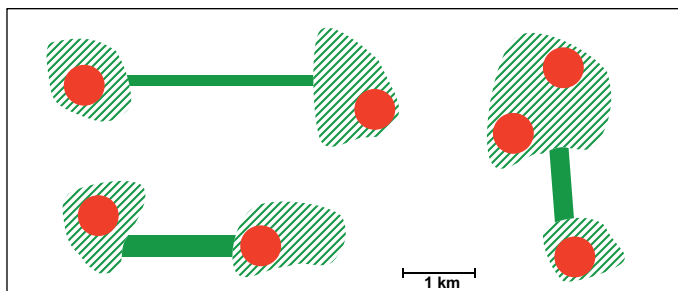


Abb. 17. Einbezug von Vernetzungskorridoren ins Probenahmedesign. In einer Landschaft liegen kleine Waldstücke (grün schraffiert). Einige dieser Waldstücke wurden mit Vernetzungskorridoren (z.B. strukturreiche Hecken mit Krautsäumen) verbunden (grüne Balken). Untersucht wird ein flugunfähiger Laufkäfer, der sich kaum über 1 km ausbreitet. Es werden Populationen in verschiedenen Waldstücken beprobt. Dabei werden sowohl mit Korridoren verbundene als auch nicht verbundene Waldstücke ins Probenahmedesign einbezogen. Ausserdem wird darauf geachtet, dass sich die beprobten Populationen in verschiedenen geografischen Distanzen befinden. Der mutmassliche Vernetzungseffekt wird durch den Vergleich der Populationen, die mittels Korridoren verbunden sind, mit der genetischen Zusammensetzung von Populationen, die dies nicht sind, (unter Berücksichtigung der geografischen Distanz) ermittelt. Hier werden sieben Populationen aus allen Waldfragmenten gesammelt. Es müsste aber nicht jedes Waldfragment untersucht werden. Ausserdem wurde in einem Waldstück an zwei Orten gesammelt, obwohl es sich wahrscheinlich um eine einzige Population handelt (unzerschnittene Situation).

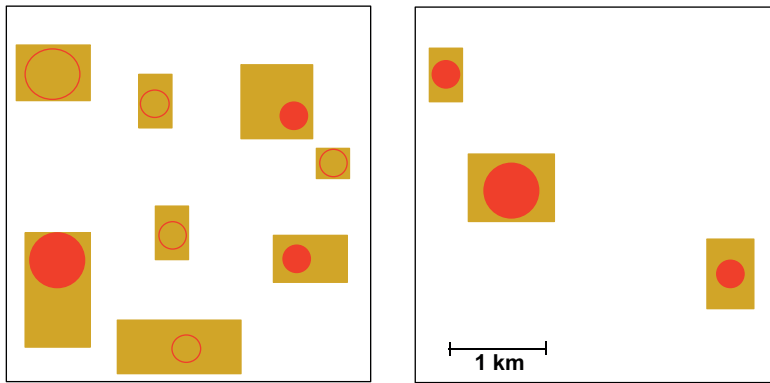


Abb. 18. Probenahmedesign für den Vergleich einer mutmasslich vernetzten und einer nicht vernetzten Landschaft. In einer Landschaft liegen viele, nahe beieinander liegende Trockenwiesen (braun), in einer anderen nur wenige. Untersucht wird eine Pflanzenart (z.B. Wundklee, *Anthyllis vulneraria*), deren Samen nur einige hundert Meter ausgebreitet werden. Es werden Populationen in den verschiedenen Trockenwiesen beprobt. Ausserdem wird darauf geachtet, dass sich die beprobten Populationen in verschiedenen geografischen Distanzen zueinander befinden. Der mutmassliche Zerschneidungseffekt wird durch den Vergleich der beiden Landschaften miteinander unter Ausschluss der geografischen Distanz bestimmt. Es muss nicht in jeder Trockenwiesenpopulation gesammelt werden (offene rote Kreise). Es werden nur sechs Populationen untersucht (gefüllte rote Kreise). Sowohl die Grösse der Populationen (Grösse der roten Kreise) wie auch die Grösse der Trockenwiesen spielt für die Erfassung der allfälligen Vernetzung keine (direkte) Rolle. Gibt es in einer Landschaft Teile mit hoher und Teile mit kleiner Lebensraumdichte, dann kann das gleiche Probenahmedesign auch nur in einer Landschaft durchgeführt werden.

pulation dokumentiert. Allenfalls ist es sinnvoll, die Lokalitäten in einer Karte, Google-Earth oder im Luftbild einzuzeichnen. Wird das Probenahmedesign auf mögliche Barrieren oder Vernetzungselemente ausgerichtet, so werden diese Barrieren ebenfalls in der Karte usw. eingetragen.

3.3.3 Wie viele Individuen pro Population werden beprobt?

Für den Naturschutz ist es wichtig, möglichst wenige Individuen pro Population zu beproben. Dies einerseits aus Kostengründen und andererseits, weil es sich oft um seltene oder gefährdete Arten handelt, welche durch die genetische Beprobung möglicherweise beeinträchtigt oder sogar getötet werden (Kapitel 3.4). Wie viele Individuen müssen pro Population mindestens beprobt werden, um aussagekräftige Resultate zu erzielen?

Für die Beantwortung dieser Frage wurden drei Quellen verwendet: Literaturangaben, eine Expertenumfrage und Simulationen. In der Literatur wird empfohlen 20 Individuen pro Population (Spanne: 15 bis 25 Individuen) zu beproben (z. B. KALINOWSKI 2005; HALE *et al.* 2012; HOBAN *et al.* 2014). Eine Befragung von Naturschutzgenetik-Experten in Mitteleuropa führte zu Angaben von 15-20 beprobten Individuen pro Population. Simulationen mit realen genetischen Datensätzen verschiedener Arten zeigten, dass die Anzahl der verwendeten Mikrosatelliten (Kapitel 3.5) entscheidender ist als die Anzahl der untersuchten Individuen pro Population (Christian Rellstab, WSL, nicht publizierte Daten). Bei 15 Mikrosatelliten sind die Ergebnisse bei etwa 15 untersuchten Individuen pro Population bereits stabil. Pro Population sollen also 15 Individuen beprobt werden. Ist die Anzahl zu beprobender Individuen nicht eingeschränkt, sind 20 Individuen pro Population besser. In Fällen, wo möglichst wenige Individuen beprobt werden sollen, reichen 12 Individuen pro Population knapp aus. Diese Anzahlen sind für die in Kapitel 3.6 und 3.7 dargestellten statistischen Standardauswertungen ausreichend (siehe aber aktuelle Wanderer, first generation migrants, in Kapitel 3.6.4, 3.7.4 und nicht-invasives Sammeln in Kasten 4).

Die Anzahl beprobter Individuen sollte in allen Populationen gleich gross sein; dies sowohl in grossen wie auch in kleinen Populationen. Die Individuen werden, soweit möglich, verstreut über die von einer Population eingenommene Fläche gesammelt

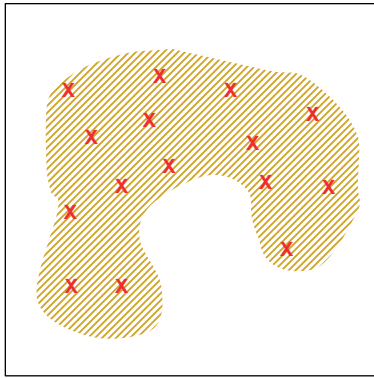


Abb. 19. Die beprobten Individuen (rote Kreuze) werden möglichst verstreut über die von einer Population eingenommene Fläche (braun schraffiert) gesammelt.

(Abb. 19). So wird bei sich vegetativ vermehrenden Arten (z. B. Pflanzen mit Ausläufern), die Wahrscheinlichkeit minimiert, dass mehrmals das gleiche Individuum beprobt wird.

Welches Material wie genau beprobt wird, wird im Kapitel 3.4 detailliert für verschiedene Organismengruppen beschrieben.

3.3.4 Spezialfall, wenn Individuen nicht Populationen zugeordnet werden können

Mobile Tierarten oder weit verbreitete und häufige Arten können manchmal nicht einzelnen, räumlich klar umrissenen Populationen zugeordnet werden. Dies gilt etwa für das Reh (*Capreolus capreolus*), für häufige Baumarten oder für viele Vögel. Hier beprobt man Individuen möglichst verstreut über eine ganze Untersuchungsregion (Abb. 20). Diese Individuen können später aufgrund von Barrieren oder genetischen Auswertungen (Kapitel 3.6, 3.7) zu Populationen zusammengefasst werden.

Man sollte für jede vermutete Population 15 bis 20 Individuen beproben. Der QR-Code jedes Individuums, dessen Koordinaten, Artname und Individuennummer sowie das Sammeldatum usw. werden in der Sample Submission Form eingetragen (Kapitel 3.4). Allenfalls ist es sinnvoll, die gesammelten Individuen in einer Karte, Google Earth oder in einem Luftbild einzuzeichnen (Kapitel 3.3.2). Die Sample Submission Form und die Karte usw. werden bei der Probeabgabe ans Labor eingereicht (Kapitel 3.4).

3.3.5 Betretbewilligungen für die untersuchten Gebiete

Bevor die Sammel-Kampagne durchgeführt wird, müssen die nötigen Betretbewilligungen eingeholt werden. Populationen können in nationalen, kantonalen, regionalen oder kommunalen Schutzgebieten oder auf Privatland liegen. Es müssen deshalb bei den entsprechenden Behörden Betretbewilligungen eingeholt oder die EigentümerInnen beziehungsweise BewirtschafterInnen informiert werden. Bei Beprobungen im Wald wird der Forstdienst informiert. Zusätzlich zu den Betretbewilligungen müssen bei gefährdeten oder geschützten Arten sowie bei Wirbeltieren und zehnfüssigen Krebsen auch Probenahmebewilligungen für die Arten eingeholt werden (Kapitel 3.4.3).

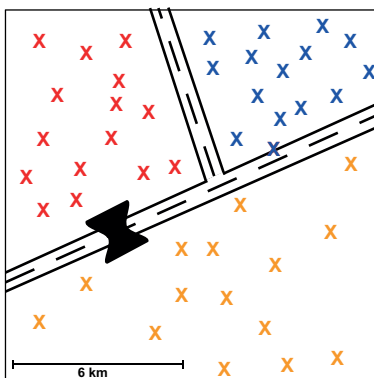


Abb. 20. Probenahmedesign, wenn die Individuen nicht Populationen zugeordnet werden können. Eine Landschaft ist durch Strassen zerschnitten. Über eine Strasse wurde eine Grünbrücke gebaut (schwarz). Untersucht wird eine mobile Tierart wie das Reh. Die Proben (Kreuze) werden für die statistische Auswertung zu drei «künstlichen» Populationen zusammengefasst (Farbe der Kreuze). In jeder der künstlichen Populationen sollte die Anzahl Proben 15 bis 20 Individuen betragen. Im Beispiel kann genetisch untersucht werden, ob eine Grünbrücke im Vergleich mit durch Strassen zerschnittenen Situationen zu Vernetzung führt. Verschiedene geografische Distanzen zwischen den Probelokalitäten der einzelnen Individuen ergeben sich praktisch von selbst.

3.4 Probenahme

Für die genetischen Analysen mit Mikrosatelliten (Kapitel 3.5) wird DNA in guter Qualität und ausreichender Menge benötigt. Je nach Organismengruppe wird verschiedenes Material gesammelt. Im Folgenden wird beschrieben, worauf dabei bei jeder Organismengruppe geachtet werden sollte. Bei der Probenahme kann, muss aber nicht, mit Handschuhen gearbeitet werden, da Mikrosatelliten artspezifisch sind und Verunreinigungen durch menschliche DNA keine Rolle spielen. Mit Alkohol ist nachfolgend immer Ethanol, purissimum, absolut, $\geq 99,8\%$ gemeint.

Für die Probenahme werden QR-Codes und ein Sample Submission Form (vom Labor zu Verfügung gestellt) und Probenbehälter wie zum Beispiel Tubes, sterile Wattestäbchen (Swabs) oder Papier-Beutelchen benötigt. Jede Probe wird mit einem individuellen QR-Code beschriftet. In der Sample Submission Form werden die QR-Codes, die Art, die Populationszugehörigkeit, Individuennummer und allfällig weitere Informationen wie Koordinaten und Sammeldatum usw. eingetragen. Somit ist die Zuordnung der einzelnen Proben mit entsprechendem QR-Code dokumentiert und es werden keine Proben vertauscht.

Die Proben werden per Post (je nach Probenmaterial gekühlt, gefroren oder bei Raumtemperatur) ins Labor gesendet. Ein Ausdruck der Sample Submission Form wird den Proben beigelegt. Zudem werden die Sample Submission Form und allfällige Karten usw. auch per E-Mail ans Labor geschickt. Es ist sinnvoll, sich vor den Feldarbeiten beraten zu lassen und sich beim Labor zu melden, um die Probenahme kurz zu besprechen.

3.4.1 Probenahme bei verschiedenen Organismengruppen

Pflanzen. Idealerweise werden frische und möglichst frisch entfaltete Blätter gesammelt. Vergilbte Blätter ergeben keine DNA guter Qualität. Es wird mindestens 100 mg Frischgewicht pro Individuum benötigt. Dies entspricht etwa der Grösse eines Daumennagels, wobei besser etwas mehr Material gesammelt wird. In der Regel werden zwei bis drei kleine Blätter oder ein grosses Blatt gesammelt (Abb. 21).

Das Blattmaterial jedes Individuums wird einzeln in Papierbeutelchen gegeben. Alle Papierbeutelchen pro Population werden in einen Kunststoffbeutel (z.B. minigrip) mit Silica-Gel (Orange-Gel; ein ungiftiges Trocknungsmittel) gegeben, und der Kunststoffbeutel aussen mit Angaben zu Art und Population versehen. Die Proben können lange in Dunkelheit bei Raumtemperatur gelagert werden. Allenfalls muss das Silicagel, wenn es weiss wird, ersetzt werden (es lässt sich durch Trocknen in einem Ofen wieder orange machen). Die Proben werden trocken via Post ans Labor gesendet. Falls kein Silica-Gel vorhanden ist, können die Blattproben bei -20°C gelagert werden. Solche Proben werden bei Raumtemperatur über Nacht per Express Post ans Labor verschickt.

Je nach Pflanzenart kann in Absprache mit dem Labor auch anderes Material verwendet werden (z. B. Bohrkern bei Bäumen).



Abb. 21. Probenahme von Pflanzen mit typischer Menge Blattmaterial pro Individuum (Foto: Daniela Csencsics).

Insekten, Spinnen und Krebse (Arthropoden). Je nach Grösse der Tiere genügt für die DNA-Gewinnung ein Bein (inkl. Oberschenkel), zum Beispiel bei Tagfaltern oder Heuschrecken. Bei grösseren Tieren kann ein Teil eines Beines ausreichend sein. Das Bein pro Individuum wird sorgfältig mit einer Pinzette abgetrennt und in ein kleines Tube gegeben (Abb. 22, Kapitel 3.4.2). Solche trockenen Proben müssen baldmöglichst via Post ans Labor gesandt werden.

Alternativ kann das Bein pro Individuum auch in ein Tube mit Alkohol gelegt werden. Proben können in Alkohol lange in Dunkelheit bei Raumtemperatur gelagert und anschliessend per Post ans Labor verschickt werden. Kleine und sehr kleine Insekten müssen getötet werden, um genügend DNA zu erhalten. Dies geschieht indem man die Tiere in mit Alkohol gefüllte Tubes gibt.

Eine weitere Möglichkeit ist das Sammeln von Larven, Raupen oder Eiern, da es in vielen Fällen einfacher ist, diese Lebensstadien als adulte Tiere zu finden und zu sammeln. Die Larven und Raupen werden ebenfalls in mit Alkohol gefüllte und beschriftete Tubes gegeben und ans Labor verschickt. Manchmal ist es nicht möglich, Material von lebenden Tieren zu sammeln. Als Alternative können zum Beispiel bei Libellen frische Larvenhäute (Exuvien) gesammelt werden (nicht-invasives Sammeln). Es ist wichtig, dass die Larvenhäute möglichst frisch sind. Dies kann man erreichen, indem man den zu beprobenden Ort einen Tag vor dem eigentlichen Sammeln absucht und alle Exuvien entfernt. Die Exuvien werden ebenfalls in mit Alkohol gefüllte Tubes gegeben und anschliessend per Post ans Labor geschickt. Man muss sich allerdings bewusst sein, dass die Laboranalysen für solche nicht-invasiven Proben aufwendiger und teurer sind (Kasten 4). Man sollte darum nur in Ausnahmefällen, etwa bei sehr seltenen und stark gefährdeten Arten, auf nicht-invasives Sammeln zurückgreifen. In jedem Falle ist es sinnvoll, bei einer nicht-invasiven Probenentnahme Rücksprache mit dem Labor zu halten.

Weichtiere (Mollusken). Mollusken müssen getötet werden, da Schleimabstriche auch bei grossen Mollusken nicht genügend DNA enthalten. Die Tiere werden als Ganzes (mitsamt allfälliger Schale) in Tubes entsprechender Grösse in Alkohol eingelegt und möglichst rasch tiefgekühlt. Anschliessend werden sie tiefgefroren via Post ans Labor geschickt.

Bei genetischen Laborarbeiten mit Mollusken ist wegen des Schleimes oft die DNA-Extraktion und Reinigung schwierig, was die Qualität der Resultate beeinträchtigen kann.

Amphibien. Bei Amphibien wird standardmässig ein Mundschleimhautabstrich mit Wattestäbchen in speziellen Tubes genommen (BROQUET *et al.* 2007). Dabei wird mit einem Wattestäbchen die Mundschleimhaut eines Tieres einige Male abgefahren (Abb. 24). Die Grösse der Wattestäbchen muss der Grösse der Tierart angepasst sein. Zum Öffnen von kleinen Mäulern (z. B. bei Molchen) haben sich Plektren aus Gitarrenfachgeschäften bewährt. Die Wattestäbchen müssen direkt nach der Probenahme gekühlt werden. Die Proben werden bei Raumtemperatur via Post ans Labor gesandt.



Abb. 22. Beine von Arthropoden können in Tubes mit oder ohne Alkohol gesammelt werden (Foto: ARNAL).



Abb. 23. Haarschnecken und für die Beprobung vorbereitete, beschriftete und mit Alkohol gefüllte Tubes (Foto: Markus Baggenstos).



Abb. 24. Mundschleimhautabstrich bei einer Gelbbauchunke (*Bombina variegata*). Die Grösse der Wattestäbchen muss der Tierart angepasst sein (Foto: ARNAL).

Werden Amphibien in einem Tümpel gefangen und dann beprobt, so lohnt es sich, zuerst die nötige Anzahl Tiere in einem Eimer zu sammeln und dann erst mit der Probenahme zu beginnen. So wird sichergestellt, dass keine Individuen doppelt beprobt werden.

Reptilien. Bei Reptilien wird standardmässig ein Mundschleimhautabstrich mit Wattestäbchen in speziellen Tubes, wie oben für Amphibien beschrieben, genommen. Es muss auch bei Reptilien sichergestellt werden, dass keine Individuen doppelt beprobt werden.

Fische. Bei Fischen werden drei bis vier Schuppen oder ein kleines Stück der Rücken- oder Schwanzflosse pro Individuum beprobt. Diese werden in Tubes mit Alkohol in Dunkelheit und bei Raumtemperatur gelagert. Die Proben werden anschliessend per Post ans Labor geschickt.

Alternativ wird auch bei Fischen mit Mundschleimhautabstrichen mit Wattestäbchen in speziellen Tubes gearbeitet. Das Vorgehen ist dabei analog zur Beprobung bei Amphibien (siehe oben). Soll DNA von Fischen aus Mundschleimhautabstrichen gewonnen werden, lohnt sich ein kleiner Vorversuch mit wenigen Proben in Zusammenarbeit mit dem Labor.

Vögel. Bei Vögeln kann verschiedenes Material gesammelt werden. Einerseits sind dies Blutproben (0,2–0,5 ml), die in Tubes mit 1 ml Alkohol gemischt werden. Andererseits können 2–4 Blutropfen auf einem Filterpapier getrocknet werden. Blutproben ergeben DNA von hoher Qualität. Beide Probenarten können bei Raumtemperatur gelagert werden. Anschliessend werden die Proben ans Labor geschickt. Das Einfangen und Handling von Vögeln muss von erfahrenen Ornithologen durchgeführt werden, um den Stress für die Tiere so gering wie möglich zu halten. Blutproben dürfen in der Schweiz nur von Veterinären und anderen Personen mit entsprechender Ausbildung genommen werden.

Alternativ kann bei Vögeln mit Mundschleimhautabstrichen mit Wattestäbchen in speziellen Tubes gearbeitet werden. Die Grösse der Wattestäbchen muss der Grösse der Vogelart angepasst sein. Das Vorgehen ist das Gleiche wie es oben für Amphibien beschrieben wurde.

Weitere DNA Quellen bei Vögeln sind Federn, Eierschalen oder Kot (SEGELBACHER *et al.* 2014). Bei diesem sogenannten nicht-invasiven Sammeln (Kasten 4) muss das Material so frisch wie möglich sein. Die genetischen Laboranalysen aus solchen nicht-invasiven Proben sind allerdings aufwändiger und deshalb teurer; ihr Einsatz muss gut überlegt sein. Bei Kotproben ist es ausserdem oft unumgänglich zuerst die Artzugehörigkeit mit genetischem Barcoding (HOLDEREGGER und SEGELBACHER 2016) zu bestimmen, was die Kosten ebenfalls erhöht.

Säugetiere. Bei Säugetieren kann verschiedenes Material gesammelt werden. Ideal ist eine Blutprobe (etwa 0,5 ml) pro Individuum, die in einem Tube mit Alkohol gelagert wird. Es können aber auch 2–4 Blutstropfen auf einem Filterpapier getrocknet werden. Beide Probearten werden bei Raumtemperatur gelagert. Anschliessend werden die Proben ans Labor geschickt. Das Einfangen und Handling von Säugetieren muss von erfahrenen Wildtierspezialisten durchgeführt werden, um den Stress für die Tiere so gering wie möglich zu halten. Blutproben dürfen in der Schweiz nur von Veterinären und anderen Personen mit entsprechender Ausbildung genommen werden.

Alternativ kann bei Säugetieren (genauso wie beim Menschen) mit Abstrichen der Mundschleimhaut mit Wattestäbchen in speziellen Tubes gearbeitet werden. Die Grösse der Wattestäbchen muss der Grösse der Tierart angepasst sein. Das Vorgehen ist das Gleiche, wie es weiter oben für Amphibien beschrieben wurde.

Als weitere Alternative bieten sich auch Gewebeproben von Säugetieren an. Dies ist etwa dann sinnvoll, wenn Gewebeproben von Tieren aus Verkehrsunfällen oder aus der Jagd gewonnen werden können (Abb. 25). Es ist dabei eine kleine Gewebeprobe (etwa 50–100 mg oder rund 8 mm³) nötig. Die Gewebeproben werden einzeln pro Individuum in Tubes mit Alkohol gesammelt. Anschliessend werden die Proben ans Labor geschickt.

Ausserdem kann DNA bei Säugetieren auch aus Haaren oder Kot extrahiert werden (Abb. 26). Bei diesem sogenannten nicht-invasiven Sammeln (Kasten 4) muss das Material so frisch wie möglich sein. Die Proben sollten sofort gekühlt werden und am gleichen Tag muss das Material gekühlt ans Labor geschickt werden. Die genetischen Laboranalysen aus solchen nicht-invasiven Proben sind aber aufwendiger als gewöhnliche Beprobungen und deshalb teurer. Bei Kotproben ist es ausserdem oft unumgänglich, zuerst die Artzugehörigkeit mit genetischem Barcoding (HOLDEREGGER und SEGELBACHER 2016) zu bestimmen, was die Kosten ebenfalls erhöht.



Abb. 25. Gewebeprobe eines Säugetiers (Ohr eines gejagten Schneehasen, *Lepus timidus*; Foto: Sabine Brodbeck).



Abb. 26. Säugetier-Kot in Tubes (Foto: Sabine Brodbeck).

Kasten 4. Nicht-invasive Probenahme

Beim nicht-invasiven Sammeln von genetischen Proben werden Tiere nicht direkt beprobt: Sie werden also nicht gefangen und durch die Probenahme nicht beeinträchtigt. Stattdessen werden Hinterlassenschaften von Arten gesammelt. Es sind dies zum Beispiel Kot, Federn, Haare, Hautreste oder Larvenhäute von Insekten wie etwa Libellenexuvien. Aus diesen Proben wird anschliessend DNA gewonnen. Angewandt wird nicht-invasives Sammeln vor allem bei scheuen Säugetieren und Vögeln.

So verheissungsvoll nicht-invasives Sammeln ist, so birgt es doch einige Nachteile. Erstens ist die Qualität der aus nicht-invasiven Proben gewonnenen DNA oft schlecht und ihre Menge gering. Das liegt daran, dass DNA an der Luft schnell abgebaut wird. Wegen der tiefen DNA-Qualität und Menge müssen die Laboranalysen für jede Probe mehrmals wiederholt werden, um gesicherte Ergebnisse zu erhalten. Dadurch steigen die Kosten für die Laboranalysen.

Zweitens werden die gleichen Tiere oft mehrmals beprobt. Man sieht dem Kot ja nicht an, von welchem Individuum er stammt. Deshalb müssen in einem Untersuchungsgebiet mehr Proben gesammelt werden, als dies bei gewöhnlichem (invasivem) Sammeln der Fall ist. Erfahrungsgemäss werden bei nicht-invasivem Sammeln die gleichen Individuen zwischen 1,5 bis vier Mal aufgefunden. Die Anzahl zu sammelnde nicht-invasive Proben pro Population muss also um einen Faktor bis 4 erhöht werden. Wiederum steigen die Kosten für die Laboranalysen.

Drittens ist nicht-invasives Sammeln nicht das Gleiche wie eDNA, wie sie im Workflow eDNA Amphibien (Kapitel 2) verwendet wird. Beim nicht-invasiven Sammeln weiss man in der Regel, um welche Art oder doch Artengruppe es sich bei einer Probe handelt und dass die Probe nur von einem Individuum stammt. Bei eDNA wird eine Probe aus der Umwelt genommen (z. B. Wasser), in der sich DNA von unzähligen Arten und Individuen befindet; von welchen, weiss man nicht.

Nicht-invasives Sammeln von genetischen Proben sollte deshalb zur routinemässigen Erfassung von Verbund nicht verwendet werden. Nur in Ausnahmefällen kann nicht-invasives Sammeln zum Zug kommen.



Abb. 27. Eine nicht-invasive Federn-Probe des Auerhuhns (*Tetrao urogallus*; links). Nicht invasives Sammeln von Auerhuhn Kot (rechts; Fotos: Kurt Bollmann).

3.4.2 Beeinträchtigung von Tieren durch die Probenahme

Tiere werden bei der Beprobung in unterschiedlicher Weise beeinträchtigt. Wirbeltiere erleiden Stress, wenn sie gefangen und beprobt (Mundabstriche, Blutabnahme) werden. Für die Tiere muss der Stress so gering wie möglich gehalten werden, indem man jedes Tier nur so kurz wie möglich behandelt.

Stärker beeinträchtigt werden Arthropoden, wenn ihnen ein Bein abgenommen wird. Vielen Arthropoden fehlt aber auch in der Natur ein Bein. Hinterbeine von Heuschrecken werden zum Beispiel bei Angriffen von Fressfeinden leicht abgeworfen und fehlen deshalb bei vielen Individuen. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass genetisch beprobte und nicht-beprobte Arthropoden die gleiche Überlebenswahrscheinlichkeit

aufweisen (MARSCHALEK *et al.* 2013). Die Beeinträchtigung der Tiere durch die genetische Probenahme ist vertretbar.

Müssen Tiere für die genetische Probenahme getötet werden, ist es bei seltenen und geschützten Arten besonders wichtig, dass die Anzahl beprobter Individuen pro Population so klein wie möglich gehalten wird (Kapitel 3.3.3).

3.4.3 Probenahmewilligungen

Sollen geschützte Arten und Arten der Roten Liste beprobt werden, dann ist eine Bewilligung der zuständigen kantonalen Stellen nötig (z.B. Fachstelle Naturschutz, Jagd und Fischerei usw.). Werden Beprobungen mit Wirbeltieren oder zehnfüssigen Krebsen durchgeführt (unabhängig davon, ob diese geschützt oder gefährdet sind), ist in der Schweiz nach Tierschutzgesetz eine Tierversuchsbewilligung nötig und die beteiligten Personen müssen einen entsprechenden Ausbildungskurs besucht haben. Das Bundesamt für Umwelt und das Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen haben eine entsprechende Anleitung für das Artenmonitoring und den Naturschutz veröffentlicht (GERNER 2018). Es lohnt sich, mit den entsprechenden kantonalen Stellen Kontakt aufzunehmen, da diese über die Bewilligungsverfahren und Anforderungen in ihrem Kanton informiert sind und wissen, was an Bewilligungen nötig ist.

3.5 Labormethoden

3.5.1 Was sind Mikrosatelliten?

Mikrosatelliten sind kurze Abschnitte der DNA von Arten (80–500 bp lang), bei welchen eine Abfolge (Motiv) von normalerweise zwei bis fünf DNA-Bausteinen (Basen) mehrfach wiederholt wird: Dies ist in Abbildung 28 für den Fall des 2-Basen Motivs GA dargestellt. Ein Mikrosatelliten Motiv wird unterschiedlich oft wiederholt (Abb. 28). Damit entstehen Mikrosatellitenvarianten (Allele) mit verschiedenen Längen. Ein Individuum kann ein oder zwei Varianten (Allele) eines Mikrosatelliten besitzen, was unterschiedliche Kombinationen solcher Allele bewirkt (Abb. 29). Mikrosatelliten weisen oft sehr viele verschiedene Allele auf und haben darum ein hohes Auflösungsvermögen. Durch die Kombination von mehreren Mikrosatelliten erhält jedes Individuum einen einzigartigen genetischen Fingerabdruck. Vaterschaftsanalysen beim Menschen basieren bis heute auf Mikrosatelliten.

Mikrosatelliten müssen für jede untersuchte Art neu entwickelt werden. Dies bedingt einen beträchtlichen Labor-Aufwand, hat aber den Vorteil, dass bei schwierig zu bestimmenden Arten allfällig falsch gesammelte Individuen erkannt werden beziehungsweise auch bei Mischproben (z.B. Kot) eine genetische Analyse möglich ist. Zudem können Mikrosatelliten aus wenig DNA erfolgreich analysiert werden.

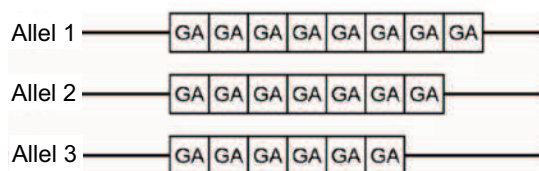


Abb. 28. Beispiel eines Mikrosatelliten mit einem 2-Basen Motiv (GA) und sechs bis acht Wiederholungen des Motivs, was zu drei Allelen mit unterschiedlichen Längen führt.

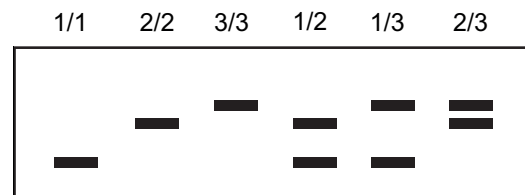


Abb. 29. Die möglichen sechs Kombinationen eines Mikrosatelliten mit drei Allelen. Das Individuum ganz links hat zweimal das gleiche Allel 1 (homozygot), während das Individuum ganz rechts ein Allel 2 und ein Allel 3 (heterozygot) trägt.

3.5.2 Sind Mikrosatelliten vorhanden oder müssen sie neu hergestellt werden?

Für viele Arten sind Mikrosatelliten bereits entwickelt worden und Angaben dazu finden sich in der Literatur (Tab. 4). Daneben haben Labore im Rahmen von durchgeführten Projekten für verschiedene weitere Arten Mikrosatelliten entwickelt. Untersuchungen werden in der Regel mit 13 bis 16 Mikrosatelliten pro Art durchgeführt.

Im Falle, dass noch keine Mikrosatelliten für eine Art vorliegen, können solche durch ein Labor entwickelt werden, was aber zu deutlich höheren Kosten führt (Kapitel 3.8). Diese Entwicklungskosten sind einmalig und wenn in Zukunft weitere Untersuchungen zu dieser Art durchgeführt werden, so fallen keine weiteren Entwicklungskosten mehr an. Im Zweifelsfalle macht es Sinn, sich beim Labor zu informieren, ob für eine Art bereits Mikrosatelliten vorhanden sind, beziehungsweise eine Offerte für eine entsprechende Entwicklung und Untersuchung einzuholen. Dabei ist es wichtig zu wissen, wie viele Populationen und Individuen (Kapitel 3.3) der Art untersucht werden sollen und um welchen Probenotyp (Kapitel 3.4) es sich handeln wird.

3.5.3 Laborprotokoll

Bei einer Mikrosatelliten-Analyse wird in einem ersten Schritt die DNA aus den Proben isoliert. Anschliessend werden die kurzen Mikrosatelliten DNA-Abschnitte, welche sich in der Länge unterscheiden, mittels der Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt, und die Allel-Längen werden auf einem traditionellen Sequenziergerät (Kapillar-Elektrophorese) bestimmt. Dabei werden mehrere Mikrosatelliten parallel untersucht (Abb. 30). Ein Individuum kann an jedem Mikrosatelliten entweder ein Allel (homozygot) oder zwei

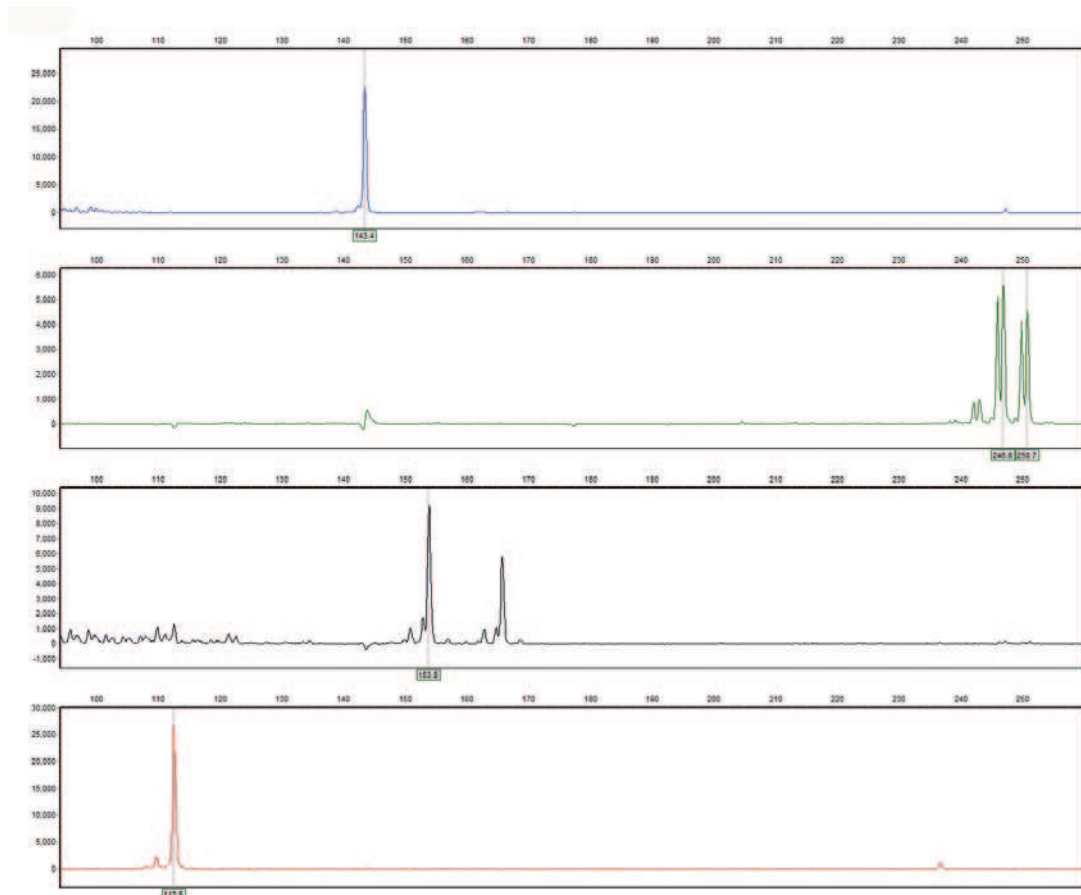


Abb. 30. Längenbestimmung von vier Mikrosatelliten für ein Individuum der Langflügeligen Schwertschrecke (*Concephalus fuscus*). Das Individuum zeigt für die Mikrosatelliten grün und schwarz jeweils zwei Allele (heterozygot), während die beiden andern Mikrosatelliten blau und rot jeweils nur ein Allel aufweisen (homozygot).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Allel Report									
2	Project:	4.80.40 KTI Project								
3	Customer:	KTI <i>Conocephalus fuscus</i>								
4	Date:	21.02.2018								
5	Analysis Type:	Fragment Length Analysis ABI3730								
6	Software Package:	SoftGenetics GeneMarker 2.6.4								
7	Panel:	Confus M1, M2, M3 & M4								
8	Size Standard:	GeneScanTM-500 LIZ Size Standard								
9										
10										
11			Marker							
12	QR-Code	SampleName	Cf_104642_FAM	Cf_23871_ATTOS32	Cf_169817_ATTOS50	1065451_ATTOS65				
13	114701	Confus_114701_F01	139	143	235	247	124	145	107	110
14	114702	Confus_114702_D01	143	143	239	243	148	169	110	110
15	114703	Confus_114703_F01	139	143	243	243	148	148	104	113
16	114704	Confus_114704_R02	143	143	215	251	139	160	0	0
17	114705	Confus_114705_D11	139	143	235	247	124	145	107	110
18	114706	Confus_114706_F02	131	143	247	251	157	163	104	113

Abb. 31. Beispiel einer Tabelle der genetischen Zusammensetzung von 11 Individuen der langflügeligen Schwertschrecke (*Conocephalus fuscus*; Zeilen mit QR-Code und Sammelnummer) und vier Mikrosatelliten (Marker; Spalten). Jeder Mikrosatellit umfasst zwei Spalten. Im Falle, wo zweimal das gleiche Allel (Fragmentlänge) angegeben ist, ist das entsprechende Individuum für diesen Mikrosatelliten homozygot (z. B. Individuum 114702 für Mikrosatellit Cf_104642). Andernfalls ist das Individuum mit zwei verschiedenen Allelen für den entsprechenden Mikrosatelliten heterozygot. Mit 0 werden fehlende Daten bezeichnet.

Allele (heterozygot) aufweisen (Abb. 29). In Abbildung 30 ist ein Ausschnitt der Fragmentlängen für vier parallel analysierte Mikrosatelliten für die Langflügelige Schwertschrecke (*Conocephalus fuscus*) dargestellt.

3.5.4 Tabelle der genetischen Zusammensetzung der untersuchten Individuen

Die Resultate der Mikrosatelliten-Analyse werden in einer Tabelle dargestellt. In Abbildung 31 ist ein Ausschnitt einer entsprechenden Tabelle für vier Mikrosatelliten und 11 Individuen der Langflügeligen Schwertschrecke (*C. fuscus*) dargestellt. Auf solchen Tabellen basieren die statistischen Auswertungen, wie sie in den Kapiteln 3.6 und 3.7 dargestellt sind.

3.6 Statistische Standardauswertungen

Für die Standardauswertungen wird die erstellte Tabelle (Kapitel 3.5.4) angepasst. Zu den individuellen Bezeichnungen der Proben, den Namen der Population und den einzelnen Mikrosatelliten und Allelen werden die X/Y-Koordinaten der beprobten Populationen hinzugefügt. Dann wird geprüft, wie viele Daten fehlen. Es sollten höchstens 10% der Individuen pro Mikrosatellit pro Population fehlen. Anschliessend sucht man mehrfach vorkommende identische Genotypen und behält nur einen davon im Datensatz. Diese Tabelle wird als Master File gespeichert und muss für die verschiedenen Auswertungsprogramme jeweils angepasst werden.

3.6.1 Genetische Gruppen

Genetische Gruppen werden mit dem Programm STRUCTURE (PRITCHARD *et al.* 2000) bestimmt. Es werden die Standardeinstellungen des Programms verwendet, das heisst, das admixture model. Das LOCPRIOR model wird nicht verwendet. Die Laufzeit orientiert sich an den Vorgaben in der Anleitung (burnin: 10000–100000; run length: 10000–100000). Für jedes k (Anzahl genetische Gruppen) werden zehn Wiederholungen gerechnet.

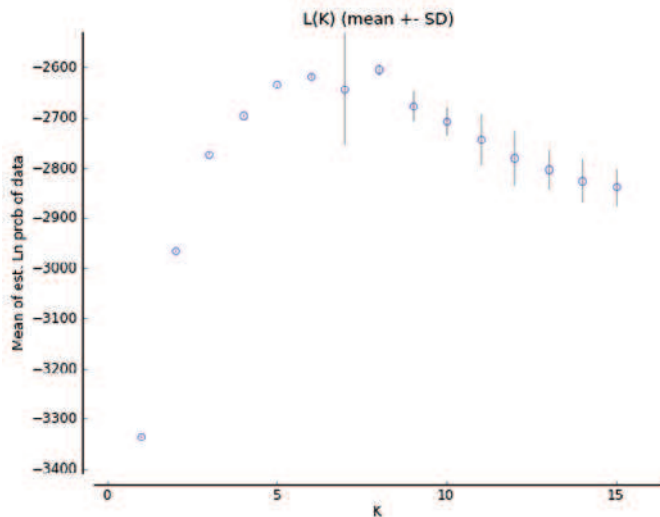


Abb. 32. Der LogLikelihood Plot wird verwendet, um die Anzahl genetischer Gruppen zu finden. Die Werte steigen von $k=1$ an, bis ein Maximum erreicht ist, in diesem Fall bei $k=6$. Es wird das k mit dem höchsten Wert verwendet, bevor die Werte entweder wieder fallen oder stark zu schwanken beginnen (vertikale Linien). In diesem Fall ist der beste Wert also $k=6$.

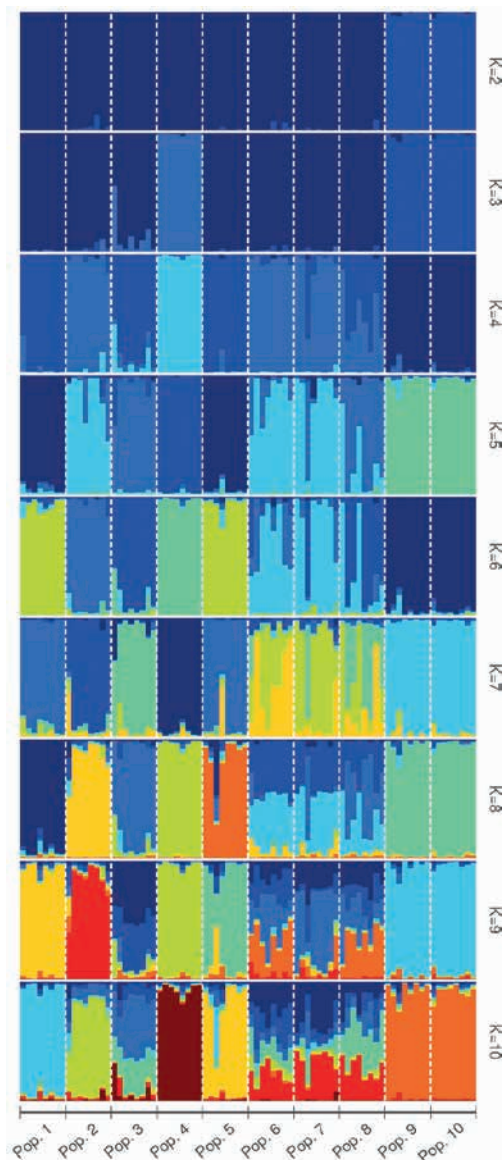


Abb. 33. Hierarchische Entwicklung der genetischen Gruppen von $k=2$ bis $k=10$. In diesem Beispiel wurden jeweils acht genetische Proben aus zehn Populationen (Pop.) untersucht. Ein vertikaler Balken entspricht einem Individuum, die Populationen sind durch weiss gestrichelte Linien getrennt. In der obersten Reihe gibt es zwei deutliche Gruppen, in der zweiten Reihe kommt Population 4 als neu gebildete Gruppe (neue Farbe) hinzu. Bis zu $k=6$ kommen vertikal weitere Gruppen dazu. Ab $k=7$ kommen keine neuen Gruppen dazu, sondern einzig zusätzliche Farben (z. B. orange). Diese führen nur zu grösserer Undeutlichkeit, das heisst, es ergibt sich keine weitere Information zur genetische Struktur. Deshalb wird im Beispiel als optimale Anzahl Gruppen $k=6$ gewählt.

Um die optimale Anzahl Gruppen zu bestimmen, werden die Resultate von STRUCTURE mit STRUCTUREHARVESTER (EARL und VON HOLDT 2012) analysiert. Es wird der LogLikelihood Plot (Abb. 32) zusammen mit der hierarchischen Entwicklung der Anzahl Gruppen (Abb. 33) als Entscheidungsgrundlage verwendet. Die oft verwendete Evanno Methode soll nicht verwendet werden, da sie nachweislich falsche Ergebnisse liefert (MEIRMANS 2015).

Wenn die optimale Anzahl genetischer Gruppen k bestimmt ist, werden die einzelnen Wiederholungen mit CLUMPP (JAKOBSSON und ROSENBERG 2007) verrechnet. Die Resultate werden anschliessend als Kuchendiagramme der Gruppenzugehörigkeiten pro Population auf einer Karte, einem Luftbild oder GoogleEarth graphisch dargestellt.

3.6.2 Austausch über viele Generationen hinweg und Isolation durch die Distanz

Zuerst werden mit dem R Paket strataG v2.0.2 (ARCHER *et al.* 2016) paarweise Fst-Werte (genetische Differenzierung) zwischen den untersuchten Populationen mit ihren statistischen Signifikanzwerten berechnet. Anschliessend testet man mit einem einfachen Mantel Test mit dem R Paket ecodist v2.0.1 (GOSLEE und URBAN 2007) auf Isolation durch die Distanz. Als Resultate werden einerseits in einer Grafik die paarweisen Fst-Werte als Funktion der geografischen Distanz aufgetragen und das Mantel r und dessen Signifikanz vermerkt und andererseits werden in einer Dreieckstabelle die paarweisen Fst-Werte zwischen allen Populationen mit ihren Signifikanzwerten gezeigt. Die geografischen Distanzen werden auf der Website von Swisstopo gemessen (maps.geo.admin.ch).

3.6.3 Austauschraten über die letzten Generationen hinweg

Mit dem Programm BAYESASS v3.0 (WILSON und RANNALA 2003) werden die paarweisen Austauschraten zwischen allen Populationen bidirektional berechnet. Es werden die Standardparameter verwendet. Als Resultat wird eine Tabelle mit den paarweisen Austauschraten gezeigt (mit Quell- und Empfängerpopulationen).

3.6.4 Aktuelle Wanderer

Wanderer der aktuellen Generation (first generation migrants) werden mit dem Programm GENECLASS v2.0 (PIRY *et al.* 2004) mit den Standardeinstellungen berechnet. Als Resultat wird eine Liste gezeigt, welche nur die festgestellten aktuellen Wanderereignisse mit den jeweiligen Quell- und Empfängerpopulationen und der jeweiligen Anzahl aktueller Wanderer enthält.

3.6.5 Barrierewirkung

Mit dem R Paket MCMCglmm v2.26 (HADFIELD 2010) wird getestet, ob die geografische Distanz zwischen den Populationen und ein Landschaftselement als Barrieren (beide als Dreieckstabellen) wirken. Dies sind die beiden unabhängigen Variablen. Die abhängige Variable sind die paarweisen Fst-Werte (oder alternativ die gemittelten paarweisen Austauschraten während der letzten paar Generationen zwischen zwei Populationen). Für die Barrierewirkung wird eine 0/1 Barrieren-Matrix hergestellt, wie dies in Kapitel 3.7.5 erklärt wird. Es ist möglich, die mögliche Barrierewirkung mehrerer Landschaftselemente gleichzeitig zu testen (für jedes Landschaftselement, das möglicherweise als Barriere wirkt, ist dann eine separate 0/1 Matrize nötig). Als Resultat werden die Beta- (standardisierte Steigungen) und Signifikanz-Werte der geografischen Distanz und der Barriere(n) aus der statistischen Auswertung angegeben.

3.6.6 Spezielle Untersuchungen verlangen spezielle Probenahmedesigns und spezielle Auswertungen

Mit den im WorkflowVerbund gewonnen genetischen Daten basierend auf Mikrosatelliten lassen sich prinzipiell weitere Auswertungen durchführen (HOLDEREGER 2017). Für den Naturschutz besonders relevant sind vertiefte Analysen dazu, welche Landschaftselemente als Barrieren oder Korridore in einem Verbund wirken (Landschaftsgenetik; BOLLIGER und

GUGERLI 2017) oder die Messung der Inzucht innerhalb von Populationen (BIBERACH und KELLER 2017). Solche zusätzlichen Analysen verlangen aber andere statistische Auswertungen als oben angegeben. Dies führt zu zusätzlichen Kosten.

- Vertiefte Landschaftsanalysen zu Verbund und Vernetzung verlangen komplexe statistische Auswertungen, welche aufwendig sein können.
- Inzucht kann mit verschiedenen Methoden genetisch erfasst werden. In der Regel sind hierzu allerdings weit mehr beprobte Individuen pro Population nötig, als in Kapitel 3.3.3 angegeben (≥ 30 Individuen).

Solche und andere spezielle statistische Auswertungen ausserhalb des Standard-Workflows werden zurzeit vor allem an Forschungsinstitutionen verwendet. Will man eine entsprechende Studie durchführen, lohnt es sich deshalb vor Beginn der Untersuchung mit Genetik-Spezialistinnen von Forschungsinstitutionen Kontakt aufzunehmen. Die WSL leitet Anfragen an entsprechende Genetik-Spezialistinnen an verschiedenen Forschungsinstitutionen weiter.

3.7 Interpretation der Resultate

Die folgende Interpretationshilfe zu den Resultaten der statistischen Standardauswertungen der genetischen Daten wird im Kasten 5 anhand eines konkreten Beispiels erläutert.

3.7.1 Genetische Gruppen

Eine der wichtigsten und intuitiv am einfachsten zu verstehenden statistischen Auswertungen genetischer Daten ist die Feststellung genetischer Gruppen. Dabei wird nur die genetische Zusammensetzung der Individuen berücksichtigt; deren Herkunft (Koordinaten) wird nicht in die Berechnung einbezogen. Auch die Anzahl der genetischen Gruppen wird nur aus den genetischen Daten selbst bestimmt und (in der Regel) nicht vorher festgelegt. Die Resultate zeigen als Kuchendiagramme, wie gross der genetische Anteil einer Population an jeder festgestellten genetischen Gruppe ist.

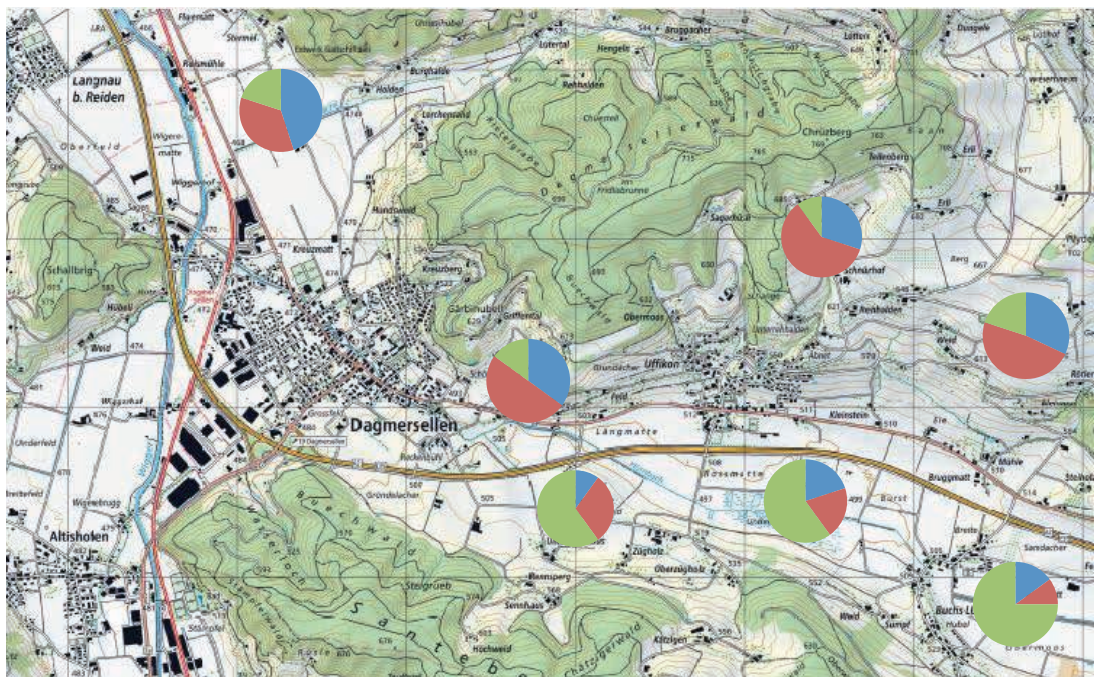


Abb. 34. Hypothetisches Beispiel einer Auswertung zu genetischen Gruppen im Schweizer Mittelland. Die statistischen Auswertungen ergaben das Vorhandensein von drei genetischen Gruppen ($k = 3$; rot, blau, grün). Die orange Linie ist eine eingezäunte Autobahn (Bewilligung swisstopo JA 100118).

Stellen wir uns in einem einfachen Beispiel drei Populationen vor. Alle Individuen der ersten Population gehören zu 100 % der gleichen genetischen Gruppe an; sagen wir der roten Gruppe. Die erste Population ist also vollständig rot. Die dritte Population soll genauso vollständig der blauen genetischen Gruppe angehören. In der Mitte der beiden Population liegt nun die zweite Population. Sie tauscht mit der ersten, roten Population 60 % der Individuen aus und mit der dritten Population, der blauen, 40 % der Individuen. Wenn das über einige Generationen so bleibt, dann erwarten wir also, dass die zweite Population eine Mischung aus 60 % Rot und 40 % Blau ist. Die erste Population hätte ein vollständig rotes, die zweite Population ein aus 60 % Rot und 40 % Blau zusammengesetztes und die dritte Population ein ganz blaues Kuchendiagramm. So deutlich, wie in diesem Beispiel sind die Ergebnisse in der Realität kaum, da die natürlichen Verhältnisse des Austauschs von Individuen und Genen zwischen Populationen in der Landschaft kompliziert sind und von vielen Faktoren abhängen.

Trägt man die Kuchendiagramme der Gruppenzugehörigkeit an den jeweiligen Koordinaten der Populationen in eine Landeskarte, ein Google Earth Bild oder ein Luftbild ein, kann man jene Landschaftselemente erkennen, die wahrscheinlich als Barrieren oder als Korridore wirken.

Abbildung 34 zeigt ein hypothetisches Beispiel einer solchen genetischen Auswertung von genetischen Gruppen. In diesem Beispiel wurden Individuen aus sieben Populationen genetisch untersucht, und die statistischen Auswertungen ergaben das Vorhandensein von drei genetischen Gruppen.

Bei der Interpretation der Resultate in Abbildung 34 muss man in vergleichender Weise und grosszügig vorgehen (keine Details interpretieren!). Die drei Populationen nördlich der Autobahn, aber östlich der Siedlung sind unter sich recht ähnlich mit einem grossen Rot-, einem mittleren Blau- und nur einem kleinen Grün-Anteil. Im Gegensatz dazu sind die drei Populationen südlich der Autobahn durch einen grossen Grün-Anteil und einen kleineren, aber unterschiedlichen Anteil an Rot und Blau gekennzeichnet. Die Populationen nördlich und südlich der Autobahn sind nicht völlig, aber genetisch doch klar voneinander verschieden, und dies über kleine geografische Distanzen hinweg. Die Autobahn wirkt also als Barriere. Schliesslich erweist sich die Population nördlich der Siedlung als zwar mit den anderen Populationen nördlich der Autobahn verwandt (wesentlicher Anteil von Rot und Blau), aber ihr Blau-Anteil ist doch grösser als bei den drei östlichen Populationen. Hier zeigt sich eine leichte Trennwirkung der Siedlung, welche aber geringer als jene der Autobahn ist.

3.7.2 Austausch über viele Generationen hinweg und Isolation durch die Distanz

Um den Austausch von Individuen und Genen zwischen Populationen über viele Generationen hinweg (zusammengefasst in beide Richtungen) zu bestimmen, werden paarweise F_{st} -Werte berechnet. Diese paarweisen F_{st} -Werte zeigen an, wie verschieden zwei Populationen in ihrer genetischen Zusammensetzung sind. Paarweise F_{st} -Werte liegen zwischen 0 und 1. Ein Wert von 0 zeigt an, dass die beiden Populationen genetisch genau gleich sind (es handelt sich also eigentlich um eine einzige Population). Ein Wert von 1 zeigt an, dass die beiden Populationen völlig verschieden voneinander sind. Ein Wert von 1 wird in der Praxis nicht erreicht. Man kann folgende Faustregeln für F_{st} -Werte basierend auf Mikrosatelliten anwenden (HOLDeregger und SEGELBACHER 2016):

- F_{st} unter 0,05 = geringe bis schwache genetische Verschiedenheit;
- F_{st} 0,05 bis 0,15 = schwache bis mittlere genetische Verschiedenheit;
- F_{st} über 0,15 = starke genetische Verschiedenheit.

Eine geringe genetische Verschiedenheit von Populationen weist auf guten Austausch zwischen Populationen hin. Ein kleiner paarweiser F_{st} -Wert bedeutet also guten Austausch an Individuen und Genen zwischen zwei Populationen. Ein hoher paarweiser F_{st} -Wert zeigt dagegen geringen oder kaum vorhandenen Austausch zwischen zwei Populationen an. Plakativ gesagt: klein = gut, hoch = schlecht. F_{st} -Werte sind nicht das Gleiche wie genetische Austauschraten wie sie in Kapitel 3.7.3 erklärt werden; F_{st} -Werte dürfen nicht als konkrete Austauschraten interpretiert werden.

Tab. 5. Beispiel für die Resultate zu paarweisen Fst-Werten und deren statistischer Signifikanz: ns: nicht signifikant; *: statistisch signifikant ($p \leq 0,05$); **: statistisch mittel signifikant ($p \leq 0,01$); ***: statistisch hoch signifikant ($p \leq 0,001$).

	Population A	Population B	Population C	Population D	Population E
Population A					
Population B	0,031*				
Population C	0,074**	0,067**			
Population D	0,086**	0,095**	0,023 ns		
Population E	0,161***	0,173***	0,182***	0,205***	

Fst wird oft als ein historisches Mass für den Austausch von Individuen und Genen zwischen Populationen bezeichnet, weil es Zeit braucht bis sich genetische Verschiedenheit aufbaut. Nehmen wir den Fall, dass eine genetisch einheitliche Population neu durch eine Autobahn zerschnitten wird, welche eine vollständige Barriere zwischen den zwei neuen (Teil-)Populationen auf den beiden Seiten der Autobahn bildet. Gerade nach dem Bau der Autobahn sind die beiden neuen Populationen natürlich genetisch genau gleich, doch mit der Zeit werden sich wegen des fehlenden Austauschs von Individuen und Genen über die Autobahn hinweg genetische Unterschiede zwischen den beiden neuen Populationen ausbilden. Es braucht also Zeit, einige bis viele Generationen, bis sich die beiden Populationen genetisch unterscheiden.

Wie lange geht das? Genau lässt sich das nicht bestimmen, da dies von vielen Faktoren abhängt, zum Beispiel von den Populationsgrössen. Kleine Populationen werden sich bald unterscheiden, bei grossen Populationen dauert es länger. Simulationen zeigen, dass bei Populationsgrössen wie sie in der Natur vorkommen in der Regel fünf bis zehn Generationen ausreichen um schon nachweisbare genetische Verschiedenheit zu erzeugen. Auch zeigen praktische Untersuchungen, dass der zerschneidende Effekt von Autobahnen nach 20 Jahren generell nachweisbar ist (HOLDEREGGER und DI GIULIO 2010). Wegen dieses letztlich nur ungenau bestimmten Zeitraums, der durch paarweise Fst-Werte angezeigt wird, spricht man von Austausch über viele Generationen hinweg. Je nachdem wie schnell sich eine Landschaft verändert hat, können sich paarweise Fst-Werte also vom Austausch über wenige Generationen hinweg oder gar von der Anzahl aktueller Wanderer, wie sie in Kapitel 3.7.3 und 3.7.4 vorgestellt werden, unterscheiden. In aller Regel zeigen die verschiedenen Auswertungen und deren Werte allerdings das gleiche Bild.

Die Resultate der statistischen Auswertungen der paarweisen Fst-Werte liegen in Form einer Dreieckstabelle vor, welche den Fst-Wert zwischen jedem Populationspaar und den entsprechenden statistischen Signifikanzwert enthält (Tab. 5).

Bei der Interpretation der Werte in der Tabelle 5 geht man wiederum grosszügig (sich nicht in Details verlieren!) und relativ vor. Das heisst, man vergleicht qualitativ die Werte zwischen den Populationspaaren. Es fällt sofort auf, dass die beiden Populationen A und B und auch die beiden Populationen C und D nur durch kleine paarweise Fst-Werte voneinander getrennt sind (0,031 bzw. 0,023), teilweise sind diese Unterschiede gerade noch statistisch signifikant, teilweise sind sie es nicht. Die beiden Populationen in diesen zwei Populationsgruppen sind also jeweils miteinander verbunden. Beide Populationsgruppen sind aber voneinander durch mittlere Fst-Werte getrennt (0,067 bis 0,095), welche alle statistisch signifikant sind. Die beiden Gruppen von je zwei Populationen sind also bereits durch viel weniger Austausch an Individuen und Genen gekennzeichnet als dies innerhalb der beiden Populationsgruppen der Fall ist. Schliesslich weisen die Populationen A bis D einen sehr hohen paarweisen Fst-Wert gegenüber der Population E auf (0,161 bis 0,205); dies in hoch signifikanter Weise. Die Population E ist also von allen anderen Populationen getrennt und stand historisch kaum mehr im Austausch mit diesen. Wie bereits in Kapitel 3.3 erwähnt, erwartet man grundsätzlich, dass der Austausch zwischen Populationen mit zunehmender geografischer Distanz zwischen den Populationen abnimmt. Um dies zu überprüfen, wird eine einfache Graphik erstellt, die alle paarweisen Fst-Werte zwischen den Populationen gegen die geografische Distanz dieser Popu-

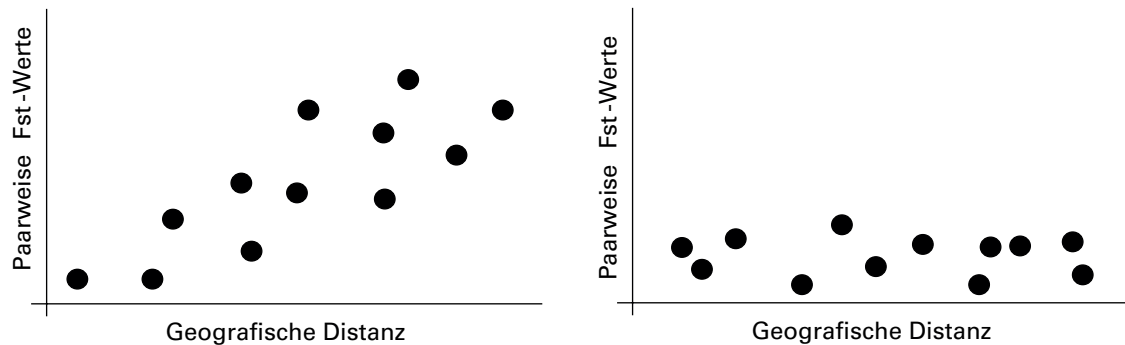


Abb. 35. Isolation durch die geografische Distanz (isolation by distance). Links: klarer Isolation durch die Distanz Effekt; rechts: keine Isolation durch die Distanz.

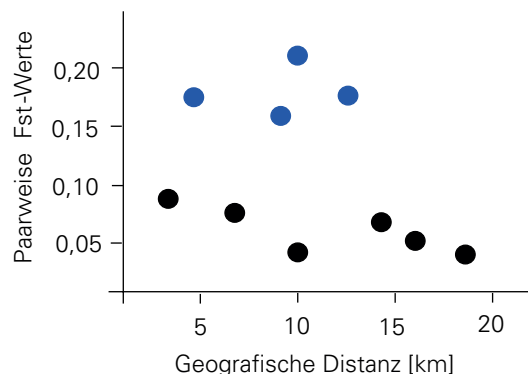


Abb. 36. Paarweise Fst-Werte aus Tabelle 5 gegenüber der geografischen Distanz (hypothetische Werte). Es ist keine Isolation durch die Distanz erkennbar. Die paarweisen Fst-Werte, welche die genetisch stark verschiedene Population E umfassen, sind blau eingezeichnet. Mantel $r = 0.11$ ns (statistische Signifikanz: ns: nicht signifikant).

lationspaare darstellt. Man nennt diese Graphik «isolation by distance», also Isolation durch die Distanz. Abbildung 35 zeigt zwei theoretische Verläufe einer solchen Isolation durch die Distanz. In Abbildung 35 links werden die paarweisen Fst-Werte mit zunehmender Distanz immer grösser, man findet also Isolation durch die Distanz. Die geografische Distanz muss somit bei der Interpretation der Fst-Werte berücksichtigt werden. In Abbildung 35 rechts bleiben die Fst-Werte hingegen mit zunehmender geografischer Distanz klein und ungefähr gleich gross. Hier gibt es keine Isolation durch die Distanz. Die geografische Distanz spielt bei der Interpretation der Resultate keine Rolle.

In Abbildung 36 sind die paarweisen Fst-Werte aus dem Beispiel von Tabelle 5 gegenüber der (hypothetischen) geografischen Distanz eingetragen. Man erkennt keinen klaren Zusammenhang zwischen der Höhe der Fst-Werte und der geografischen Distanz. Letztere spielt also bei der Interpretation keine Rolle. Dies wird auch durch den statistischen Test angezeigt. Ökologisch weisen Werte des Mantel r (Korrelationskoeffizient) unter 0,1 auf keinen oder einen sehr schwachen Zusammenhang, Werte zwischen 0,1 und 0,3 auf mittel starke Zusammenhänge und Werte über 0,3 auf einen starken Zusammenhang hin. Im Beispiel ist der Zusammenhang schwach und auch statistisch nicht signifikant. Ganz im Gegenteil, findet man die hohen paarweisen Fst-Werte, welche die genetisch stark verschiedene Population E (blaue Punkte) umfassen, sowohl über kurze als auch über mittlere geografische Distanzen. Diese starke genetische Verschiedenheit der Population E wird also nicht einfach durch eine erhöhte geografische Distanz zu allen anderen Populationen hervorgerufen, sondern muss durch einen anderen Effekt, zum Beispiel eine Ausbreitungsbarriere, bedingt sein.

3.7.3 Austauschraten über die letzten Generationen hinweg

Austauschraten (Migrationsraten) über die letzten paar Generationen hinweg (≤ 5 Generationen) zeigen an, welcher Prozentsatz einer Population zu welcher anderen Population gewandert ist. Eine Austauschrate von 0,05 zwischen Population A und Population B, bedeutet, dass 5% der Tiere in den letzten paar Generationen von A nach B gewandert

Tab. 6. Beispiel für die Resultate zu Austauschraten über die letzten paar Generationen hinweg.

	Empfänger				
	Population A	Population B	Population C	Population D	Population E
Quelle	Population A	0,201	0,191	0,013	0,011
	Population B	0,102	0,099	0,005	0,007
	Population C	0,110	0,098	0,011	0,010
	Population D	0,015	0,011	0,013	0,001
	Population E	0,012	0,005	0,005	0,001

sind. Dies ist ein beträchtlicher Anteil. Wenn Population A eine Grösse von 300 Tieren hat, entspricht dies 15 Tieren, die erfolgreich von A nach B gewandert sind. Austauschraten können maximal einen Wert von 1, also von 100 %, erreichen. Dies ist in der Realität natürlich nie der Fall.

Austauschraten geben jeweils beide Richtungen des Austauschs an, also sowohl von A nach B, als auch von B nach A. Dies ist für den Naturschutz darum interessant, weil so Quell- und Senkenpopulationen in einem ökologischen Verbund erfasst werden können.

Die Resultate der statistischen Auswertungen der Austauschraten über die letzten paar Generationen hinweg liegen in Form einer Tabelle vor, welche links die Quellpopulationen und oben die Empfängerpopulationen beinhaltet (Tab. 6). Die Tabelle enthält also die Austauschraten zwischen jeder Population mit jeder anderen untersuchten Population.

Bei der Interpretation der Resultate aus Tabelle 6 geht man in vergleichender und grosszügiger (nicht einzelne Details interpretieren!) Art und Weise vor. Die drei Populationen A, B und C sind durch recht hohe Austauschraten miteinander verbunden (in allen Fällen grösser als 0,098). So beträgt die Austauschrate über die letzten paar Generationen hinweg von Population A zu Population B 0,201 und von B zu A 0,102. Es fällt sofort auf, dass die Austauschraten der Population A zu den Populationen B und C rund doppelt so hoch, wie jene der Populationen B und C zur Population A sind. Dies bedeutet, dass Population A im Verbundsystem A/B/C mehr Wanderer aussendet, als sie von den Populationen B und C erhält: A ist also eine Quelle. Die Populationen A, B und C sind ausserdem viel weniger mit den Populationen D und E verbunden: die Austauschraten über die letzten paar Generationen hinweg sind hier rund zehnmal tiefer (0,005 bis 0,013): Es findet nur gelegentlich Austausch von Individuen und Genen statt. Schliesslich scheinen die beiden Populationen D und E während der letzten paar Generationen nicht durch Austausch miteinander verbunden gewesen zu sein (Austauschrate von D zu E und von E zu D in beiden Fällen = 0,001).

3.7.4 Aktuelle Wanderer

Aktuelle Wanderer sind jene Individuen (Tiere oder Samen bei Pflanzen), die innerhalb der jetzigen Generation von einer Population zu einer anderen Population gewandert sind (first generation migrants). Dies entspricht also aktuellem Austausch zwischen Populationen. In aller Regel werden nur wenige solcher aktueller Wanderer mit genetischen Methoden bestimmt, und man muss sich bei der Interpretation der Resultate nicht wundern, wenn kaum ein aktueller Wanderer entdeckt wird.

Wieso ist das so? Erstens, gibt es in der Natur meist tatsächlich nur wenige aktuelle Wanderer zwischen Populationen, zweitens wurde nur eine Stichprobe aller in einer Population vorhandenen Individuen beprobt und drittens ist diese Stichprobe pro Population meist klein. Je grösser die Stichprobe, desto grösser wäre die Chance aktuelle Wanderer zu finden. Wie in Kapitel 3.3.3 vorgeschlagen, werden in der Regel nur 15–20 Individuen pro Population genetisch beprobt. Das ist eine zu kleine Stichprobe, um mit einiger Wahrscheinlichkeit aktuelle Wanderer zu bestimmen. Sind aktuelle Wanderer in einer Untersuchung besonders wichtig, dann müssen mehr Individuen pro Population (≥ 30) genetisch untersucht werden.

Tab. 7. Beispiel einer Liste der Resultate zu aktuellen Wanderern. Es wurden Individuen aus sieben Populationen (A bis G) genetisch untersucht.

Population B zu Population A:	1
Population G zu Population B:	2
Population F zu Population D:	1
Population C zu Population E:	1
Population G zu Population D:	1
Population G zu Population F:	3

Die Resultate der statistischen Auswertungen zu aktuellen Wanderern werden in einer (meist kurzen) Liste von aktuellen Wanderereignissen dargestellt: Diese zeigt, wie viele Individuen aktuell, also innerhalb einer Generation, von dieser Population zu jener Population gewandert sind. Es werden nur jene Populationen aufgeführt, zwischen denen ein aktuelles Wanderereignis entdeckt wurde; Populationspaare ohne entdecktes Wanderereignis werden nicht dargestellt.

Tabelle 7 zeigt die hypothetischen Resultate einer Auswertung zu aktuellen Wanderern. Als erstes fällt auf, dass – wie oben erklärt – nur wenige aktuelle Wanderereignisse entdeckt wurden: von 42 möglichen Wanderrichtungen (21 Populationsvergleiche je in beide Richtungen) wurden nur in sechs Fällen aktuelle Wanderer und meistens auch nur ein einziger aktueller Wanderer entdeckt. Allerdings zeigt sich, dass Population G mehrfach aktuelle Wanderer an andere Population ausgesendet hat und dass dies jeweils zwischen einem und drei aktuellen Wanderern waren. Population G spielt also im Verbund eine wichtige Rolle. In allen in der Liste nicht dargestellten Fällen wurden – wie oben erwähnt – keine aktuellen Wanderer entdeckt.

Auch wenn oft nur wenige aktuelle Wanderer gefunden werden, so ist es doch möglich diese über grössere Distanzen oder ganze Landschaften hinweg genetisch nachzuweisen; etwas, was zurzeit kaum mit einer anderen Methode möglich ist. Dies ist etwa dann interessant, wenn man unmittelbar nach dem Bau eines Wildtierdurchlasses unter einer Autobahn hindurch untersuchen will, ob der Durchlass zur weiträumigen Wanderung beim Reh (*Capreolus capreolus*) führt oder wenn man wissen möchte, von welcher Quellpopulation aus die Kreuzkröte (*Epidalea calamita*) neue Trittsteinbiotope besiedelt hat.

3.7.5 Barrierewirkung

Bei dieser statistischen Auswertung wird getestet, ob eine Barriere den Austausch von Individuen und Genen behindert und ob sich das genetisch nachweisen lässt.

Für diese statistische Auswertung ist es nötig eine klare Hypothese zu einer möglichen Barriere zu formulieren. Einerseits kann diese Hypothese schon vor der Untersuchung bekannt sein und soll nun mit genetischen Methoden überprüft werden. Beispielsweise will man testen, ob konventionelles Landwirtschaftsland eine stärkere Barriere für den Austausch von Individuen und Genen darstellt als Landwirtschaftsland mit einem höheren Anteil an Biodiversitätsförderflächen. Andererseits zeigt sich die Hypothese vielleicht erst bei der Interpretation der oben dargestellten Resultate. Zum Beispiel schliesst man aus den Resultaten zu genetischen Gruppen in Abbildung 34, dass die Autobahn eine Barriere bildet. Dies möchte man nun statistisch testen.

Wie setzt man diese Hypothese in eine statistisch überprüfbare Form um. Dies wird anhand Abbildung 37 erklärt. Es wurden sechs Populationen (A–F) gesammelt und genetisch untersucht. Die Annahme ist, dass das graue Siedlungsband in der Mitte von Abbildung 37, die beiden Populationsgruppen A–C und D–F voneinander trennt, also als Barriere für den Austausch von Individuen und Genen wirkt. Nun wird eine Dreieckstabelle gebildet, in der angegeben wird, ob zwei Populationen auf der gleichen Seite der möglichen Barriere liegen (0 = keine Barriere) oder durch die mögliche Barriere getrennt sind (1 = Barriere). Beispielsweise erhält der Vergleich von Populationen A und B eine 0,

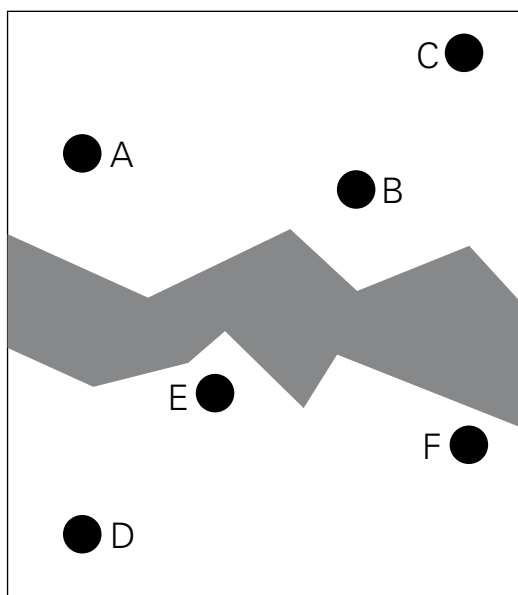


Abb. 37. Sechs beprobte und genetisch untersuchte Populationen (A bis F). Als Hypothese könnte das Siedlungsband (grau) als Barriere wirken. Die drei Populationen nördlich des Siedlungsbands wären dann von den drei südlichen Populationen getrennt.

da sie auf der gleichen Seite des Siedlungsbands liegen, während die Populationen A und E auf verschiedenen Seiten des Siedlungsbands eine 1 erhalten. Dasselbe wird für alle Populationspaare durchgeführt. Diese Dreieckstabelle (Tab. 8) fließt anschliessend zusammen mit anderen Daten wie der geografischen Distanz zwischen den Populationen (Kapitel 3.6.5) und den paarweisen F_{st} -Werten zwischen den Populationen (Kapitel 3.6.2) in die statistischen Auswertungen ein.

Die statistischen Auswertungen zur Barrierewirkung sind komplex und aufwändig (Landschaftsgenetik). Uns interessieren aber in der Regel nur zwei Werte aus diesen Auswertungen (Tab. 9). Erstens ist dies der β -Wert (positive oder negative Werte), welcher anzeigt, wie stark eine Variable die genetische Verschiedenheit von Populationen (paarweise F_{st} -Werte) beeinflusst. Ökologisch hat ein β -Wert von weniger als 0,1 kaum einen Einfluss (auch wenn er statistisch signifikant sein mag), β -Werte zwischen 0,1 und 0,30 haben einen mittleren Effekt, und β -Werte über 0,3 weisen auf starke oder sehr starke Effekte hin. Zweitens ist die statistische Signifikanz des β -Werts von Bedeutung. Im hypothetischen Beispiel aus Tabelle 9, welches sich auf die in Abbildung 37 gezeigte

Tab. 8. Dreieckstabelle, die im Vergleich mit Abbildung 9 zeigt, welche Populationen durch eine mögliche Barriere (Siedlungsband) getrennt sind (1), beziehungsweise welche nicht durch eine mögliche Barriere getrennt sind (0).

	Population A	Population B	Population C	Population D	Population E	Population F
Population A						
Population B	0					
Population C	0	0				
Population D	1	1	1			
Population E	1	1	1	0		
Population F	1	1	1	0	0	

Tab. 9. Beispiel der Resultate zu den statistischen Standardanalysen zur Barrierewirkung (statistische Signifikanz: *: statistisch signifikant, $p \leq 0,05$; ***: statistisch hoch signifikant, $p \leq 0,001$).

Geografische Distanz	$\beta = 0,061^*$
Barriere (Siedlungsband)	$\beta = 0,315^{***}$

Kasten 5: Beispiel statistische Standardauswertung Workflow Verbund: Gelbbauchunke

Datenerhebung

An sechs Orten (Abb. 38, Tab. 10) wurden insgesamt 80 Gelbbauchunken (*Bombina variegata*; Abb. 39) beprobt; jeweils 11 bis 14 Individuen pro Ort. Die Probeorte wurden so gelegt, dass einige vermutlich kleinräumig vernetzte Populationen mit zwei eventuell isolierten Populationen in grösseren Distanzen (bis über 10 km) verglichen werden können. Die Populationen der Gelbbauchunken im Gebiet waren klein, weshalb die angestrebte Minimalzahl von 15 Individuen pro Ort nicht erreicht wurde. Zur Gewinnung der DNA wurden Mundschleimhautabstriche genommen. Die genetischen Analysen wurden mit 19 Mikrosatelliten durchgeführt. Es gab keine fehlenden Daten.

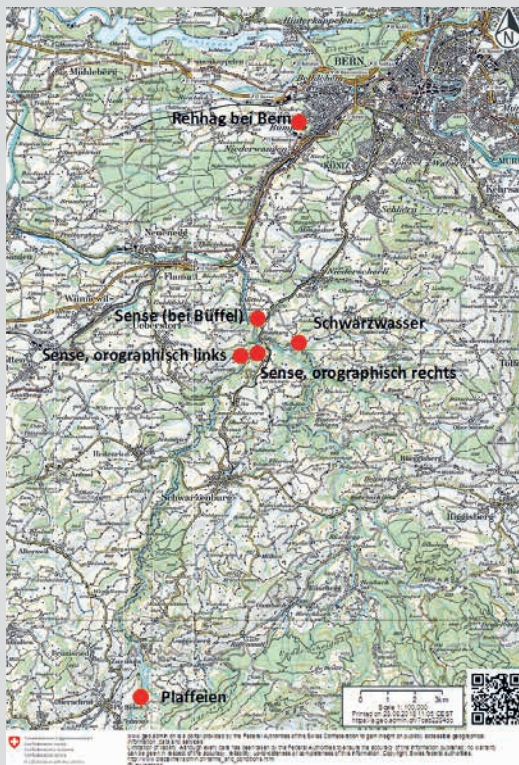


Abb. 38. Karte mit den sechs Populationen (rote Kreise), in welchen Gelbbauchunken beprobt wurden (Bewilligung swisstopo JA 100118).



Abb. 39. Gelbbauchunke (*Bombina variegata*; Foto: ARNAL).

Tab. 10. Anzahl Proben pro Population und Koordinaten der Populationen.

Population	Anzahl Proben	X	Y
Schwarzwasser	14	2595061	1190169
Sense (bei Büffel)	14	2593933	1190893
Rehhag	14	2595517	1198045
Sense (orogr. links)	14	2593386	1189506
Sense (orogr. rechts)	13	2593583	1189661
Plaffeien	11	2589240	1176621

Statistische Standardauswertungen

Genetische Gruppen

Die untersuchten Populationen können am besten in drei genetische Gruppen eingeteilt werden (Abb. 40). Die am nördlichsten gelegene Population Rehhag ist durch einen hohen Blau-Anteil gekennzeichnet. Die restlichen fünf Populationen haben eine untereinander ähnlichere genetische Zusammensetzung, die sich deutlich von der Population Rehhag unterscheidet.

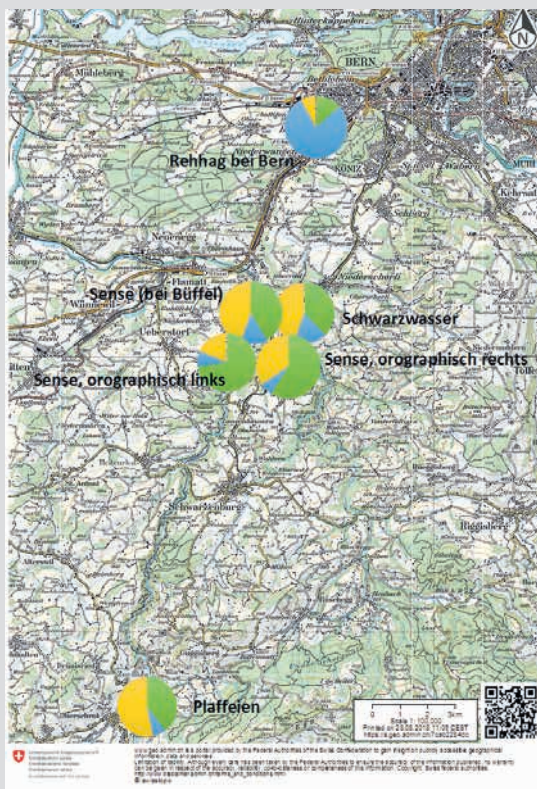


Abb. 40. Genetische Gruppen der untersuchten Gelbbauchunkenpopulationen. Die Farben im Kuchendiagramm geben die genetische Zusammensetzung der Populationen an (STRUCTURE, $k=3$; Bewilligung swisstopo JA 100118).

Austausch über viele Generationen hinweg und Isolation durch die Distanz

Gemäss Mantel-Test ($r = 0,36$ ns) gibt es keine Isolation durch die Distanz (Abb. 41).

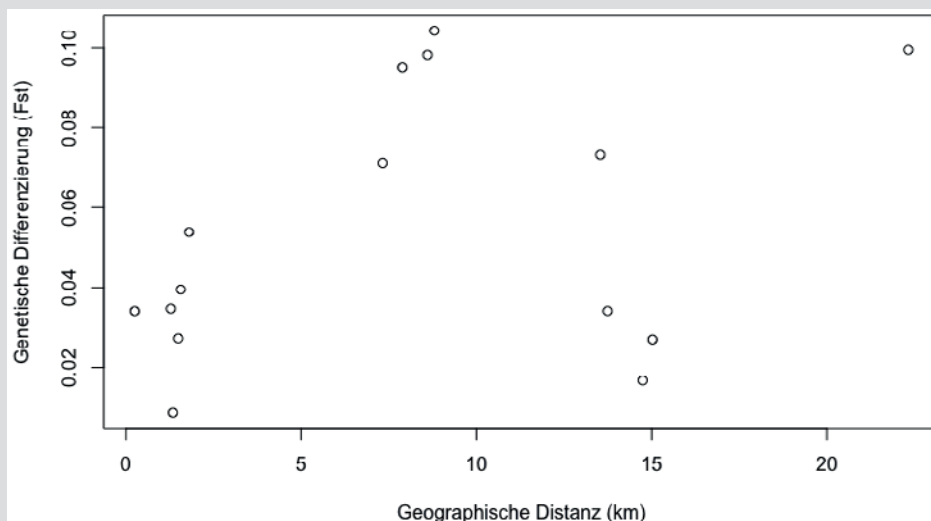


Abb. 41. Paarweise Fst-Werte (genetische Differenzierung) in Abhängigkeit der geographischen Distanz.

Tab. 11. Paarweise Fst-Werte (genetische Differenzierung). ns: nicht signifikant; *: statistisch signifikant, $p \leq 0,05$; **: statistisch mittel signifikant, $p \leq 0,01$; ***: statistisch hoch signifikant, $p \leq 0,001$.

Population	Rehhag	Sense (Büffel)	Schwarzwasser	Sense (links)	Sense (rechts)
Rehhag					
Sense (Büffel)	0,071***				
Schwarzwasser	0,095***	0,009 ns			
Sense (links)	0,104***	0,027*	0,054**		
Sense (rechts)	0,098***	0,034*	0,039**	0,034**	
Plaffeien	0,099***	0,027*	0,016 ns	0,073***	0,034*

Es gibt eine mittlere genetische Differenzierung zwischen der Population Rehhag und allen anderen Populationen (Tab. 11). Diese ist nicht auf Isolation durch die geografische Distanz zurückzuführen (Abb. 41). Zwischen den anderen Populationen ist die genetische Differenzierung in fast allen Fällen gering. Dies gilt auch für die weit abgelegene Population Plaffeien.

Austauschraten über die letzten Generationen hinweg

Tab. 12. Austauschraten während der letzten Generationen. Die Quellpopulationen stehen in der Spalte ganz links, die Empfängerpopulationen stehen in der Titelzeile.

Quelle / Empfänger	Rehhag	Sense (Büffel)	Schwarz-wasser	Sense (links)	Sense (rechts)	Plaffeien
Rehhag		0,02	0,02	0,02	0,02	0,03
Sense (Büffel)	0,02		0,02	0,02	0,02	0,02
Schwarzwasser	0,02	0,03		0,02	0,02	0,02
Sense (links)	0,02	0,02	0,02		0,02	0,02
Sense (rechts)	0,02	0,02	0,02	0,02		0,02
Plaffeien	0,14	0,23	0,25	0,25	0,24	

Auffällig sind die grossen Austauschraten der Population Plaffeien zu allen anderen Populationen (Tab. 12). Eine Erklärung könnte sein, dass es sich hier um die Ursprungspopulation der anderen Populationen handelt. Alle anderen Populationen sind durch eher kleine Austauschraten gekennzeichnet.

Aktuelle Wanderer

In der aktuellen Generation wurden keine Wanderer von einer Population zu einer anderen gefunden. Dies ist ein häufiges Ergebnis, da es schwierig ist mit einer kleinen Anzahl von Proben, aktuelle Wanderer genetisch nachzuweisen (Kapitel 3.7.4).

Barrierewirkung

Falls man die Wirkung einer Barriere statistisch testen will, muss man das Probedesign entsprechend planen. Die Barrierewirkung der südlich von Rehhag verlaufenden Autobahn war in dieser Untersuchung nicht die zentrale Frage. Eine statistische Analyse zeigt, dass die Autobahn eine gewisse Barrierewirkung hat (Tab. 13). Aufgrund des Probenahmedesigns gibt es jedoch eine grosse Korrelation zwischen den Variablen «durch Autobahn getrennt» und «an Sense/Schwarzwasser liegend» und man kann nicht bestimmen, ob die Trennung durch die Autobahn oder durch die Lage an der Sense für den gefundenen Effekt verantwortlich ist. Falls man gezielt die Barrierewirkung der Autobahn untersuchen wollte, hätte man mehrere Populationen auf jeder Seite der Autobahn beproben müssen. Die geografische Distanz zeigte genau wie der Isolation durch die Distanz Test (Abb. 41) keinen Effekt.

Tab. 13. Statistische Auswertungen der Barrierewirkung. ns: nicht signifikant; **: statistisch mittel signifikant.

Geografische Distanz	$\beta > 0,001$ ns
Barriere (Autobahn)	$\beta = 0,056^{**}$

Schlussfolgerungen

Die Populationen Plaffeien, Schwarzwasser, Sense (Büffel), Sense (orogr. links) und Sense (orogr. rechts) haben eine ähnliche genetische Struktur, ihre genetische Differenzierung ist gering und es fand in den letzten Generationen genetischer Austausch statt, wobei von der Population Plaffeien am meisten Individuen in andere Populationen wanderten. Die am nördlichsten gelegene Population Rehhag hat mit den anderen Populationen gesamthaft wenig genetischen Austausch, sie gehört zu einer anderen genetischen Gruppe und die genetische Differenzierung ist beträchtlich. Die Autobahn stellt eine mögliche Barriere dar.

Situation bezieht, zeigt sich, dass die geografische Distanz nur einen sehr schwachen Effekt auf die genetische Verschiedenheit der Populationen ausübt (kleiner, wenn auch statistisch signifikanter β -Wert). Ganz im Gegensatz dazu hat die Barriere, im vorliegenden Fall also das Siedlungsband, einen starken Effekt (grosser, hoch signifikanter β -Wert). Das Siedlungsband wirkt also als Barriere für den Austausch von Individuen und Genen zwischen den untersuchten Populationen.

3.8 Kosten

Die Kosten für die Analyse des Verbunds bestehen aus dem Einholen der notwendigen Bewilligungen, der Probenahme im Feld, dem dafür benötigten Material, den Mikrosatelliten-Analysen im Labor und der statistischen Standardauswertungen mit Interpretation. Die Kosten (inklusive Material für die Probenahme) sind unter www.naturschutzgenetik.ch aufgeführt. Beispielsweise belaufen sich die Kosten für die reinen Laboranalysen mit Mikrosatelliten von 90 Individuen aus sechs Populationen momentan auf ungefähr 6500 CHF (ohne MwSt).

4 Fazit und Ausblick

Der Nutzen des Werkzeugkastens Naturschutzgenetik zeigt sich in vier Bereichen. Erstens können mit der Erfassung der Amphibien anhand von eDNA Arten nachgewiesen werden, die mit herkömmlichen Methoden nur mit erheblichem Aufwand nachweisbar sind. Zudem können Arten unterschieden werden, die morphologisch nicht oder schwierig zu unterscheiden sind. eDNA Untersuchungen von Amphibien ergänzen herkömmliche Amphibienaufnahmen somit in idealer Art und Weise.

Zweitens ist es ein wichtiges Naturschutzziel, zerschnittene Lebensräume und ihre Populationen miteinander zu vernetzen und in einen Verbund zu integrieren. Hier liefert die Naturschutzgenetik einen wesentlichen Beitrag zum Nachweis von Verbund oder Vernetzung. Zurzeit ist dies die einzige Methode, die für (fast) alle Organismengruppen mit vertretbarem Aufwand anwendbar ist, um Verbund oder Isolation auf Landschaftsebene festzustellen. Der Werkzeugkasten Naturschutzgenetik beinhaltet einen Workflow, der für die Naturschutzpraxis ein standardisiertes und optimiertes Verfahren für die Untersuchung von Verbund mit genetischen Methoden anbietet.

Drittens wurden die Workflows so konzipiert, dass sie auf andere Ziellebensräume und Zielarten beziehungsweise Zielartengruppen übertragbar sind. Der entwickelte Werkzeugkasten Naturschutzgenetik ist deshalb einfach erweiterbar und in Zukunft methodisch anpassbar. Zurzeit erfolgt dies für den Nachweis von Libellen und Fischen mittels eDNA aus Wasserproben. In Zukunft wird auch ein methodischer Update von Mikrosatelliten zu modernen single nucleotide polymorphisms (SNPs; HOLDeregger und SEGELBACHER 2016) und next generation sequencing im Workflow Verbund nötig sein. Entsprechende Bestrebungen laufen bereits auf europäischer Ebene (<https://www.cost.eu/actions/CA18134>)

Viertens ist es gelungen, der Nutzung genetischer Methoden durch die Praxis Vor-schub zu leisten. Zwölf Kantone und sieben private Umweltbüros aus der Schweiz und Österreich haben (in Zusammenarbeit mit ARNAL und ecogenics) bereits entsprechende genetische Studien ausgeführt. Zusätzlich wird im langfristigen Monitoring Wirkungskontrolle Biotopschutz Schweiz des Bundesamts für Umwelt der Workflow eDNA Amphibien seit 2017 routinemässig zur Überwachung der Amphibienbestände in den Biotopen von nationaler Bedeutung der Schweiz eingesetzt (<https://biotopschutz.wsl.ch/de.html>).

Somit schafft der Werkzeugkasten Naturschutzgenetik die Basis für eine enge Zusammenarbeit zwischen Naturschutzpraxis, Wirtschaft und Forschung, die zu einer fortlaufenden Weiterentwicklung des Werkzeugkastens und zur wirksamen Anwendung der Naturschutzgenetik bei der Erhaltung und Förderung der Biodiversität in der Schweiz führen kann.

5 Dank

Wir danken InnoSuisse (Gesuch 19204.1 PFLS-LS), dem Bundesamt für Umwelt (BAFU) und den Kantonen Aargau, Appenzell Ausserrhoden, Bern, Genf, Luzern, Ob- und Nidwalden, Schaffhausen, Thurgau, Uri, Zug und Zürich für die finanzielle Unterstützung der Pilotprojekte des Werkzeugkastens Naturschutzgenetik. Die Wirkungskontrolle Biotop-schutz Schweiz hat im Rahmen ihres Amphibien-Monitorings geholfen, den Workflow eDNA Amphibien auszutesten. Andreas Müller (Natur Umwelt Wissen) hat wertvolle Kommentare zum Zielartenset Workflow Verbund gegeben, Sam Cruickshank (Univer-sität Zürich, WSL) hat Berechnungen zu den Schwellenwerten für einen sicheren Art-nachweis im Workflow eDNA Amphibien durchgeführt, Christian Rellstab (WSL) hat um-fangreiche Simulationen zur Anzahl zu beprobender Individuen und zur nötigen Anzahl Mikrosatelliten im Workflow Verbund gerechnet und Christoph Küffer sowie Susanne Schellenberger (beide HS Rapperswil) haben organisatorische Unterstützung geleistet.

6 Literatur

- ARCHER, F.I.; ADAMS, P.E.; SCHNEIDERS, B.B., 2016: STRATAG: an R package for manipulating, summarizing and analysing population genetic data. *Molecular Ecology Resources* 17: 5–11.
- BAFU, 2011: Liste der nationalen prioritären Arten. BAFU, Bern.
- BAFU, 2016: Forschungskonzept Umwelt für die Jahre 2017–2020. BAFU, Bern.
- BAFU, 2017: Aktionsplan Strategie Biodiversität Schweiz. BAFU, Bern.
- BALINT, M.; NOWAK, C.; MARTON, O.; PAULS, S.U.; WITTWER, C.; ARAMAYO, J.L.; SCHULZE, A.; CHAMBERT, T.; COCCHIARARO, B.; JANSEN, M., 2018: Accuracy, limitations and cost efficiency of an eDNA-based community survey in tropical frogs. *Molecular Ecology Resources* 18: 1415–1426.
- BIEBACH, I.; KELLER, L., 2017: Inzucht und ihre Bedeutung für den Naturschutz. *WSL Berichte* 60: 15–22.
- BERTHOUD, G.; LEBEAU, R.P.; RIGHETTI, A., 2004: Nationales ökologisches Netzwerk REN. BUWAL, Bern.
- BOLLIGER, J.; GUGERLI, F., 2017: Isoliert oder vernetzt? Auswirkungen der Landschaft auf den Genfluss. *WSL Berichte* 60: 23–29.
- BROQUET, T.; BERSET-BRAENDLI, L.; EMARESI, G.; FUMAGALLI, L., 2007: Buccal swabs allow efficient and reliable microsatellite genotyping in amphibians. *Conservation Genetics* 8: 509–511.
- CSENCICS, D.; GUGERLI, F. (Hrsg.), 2017: Naturschutzgenetik. *WSL Berichte* 60: 1–82.
- DELARZE, R.; GONSETH, Y., 2015: Lebensräume der Schweiz. Ott, Bern.
- Departement Finanzen und Ressourcen; Department Bau, Verkehr und Umwelt Kanton Aargau, 2015: Vernetzungskonzept Kanton Aargau. Departement Finanzen und Ressourcen, Department Bau, Verkehr und Umwelt Kanton Aargau, Aarau.
- DEINER, K.; BIK, H.M.; MÄCHLER, E.; SEYMOUR, M.; LACOURSIÈRE-ROUSSEL, A.; ALTERMATT, F.; CREER, S.; BISTA, I.; LODGE, D.M.; DE VERE, N.; PFRENDER, M.E.; BERNATCHEZ, L., 2017: Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* 26: 5872–5895.
- EARL, D.A.; VON HOLDT, B.M., 2012: STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359–361.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A., 2010: Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; RALLS, K.; ERDRIDGE, M.D.B.; DUDASH, M.R.; FENSTER, C.B.; LACY, R.C.; SUNNUCKS, P., 2017: Genetic management of fragmented animal and plant populations. Oxford University Press, Oxford.
- GERNER, T., 2018: Fang, Markierung und Beprobung von freilebenden Wildtieren. Vollzugshilfe zur Überwachung der Bestände und bei Erfolgskontrollen. BAFU, Bern.
- GOSLEE, S.C.; URBAN, D.L., 2007: The ecodist package for dissimilarity-based analysis of ecological data. *Journal of Statistical Software* 22: 1–19.
- GRAF, R.; BIRRER, S.; PFIFFNER, L., 2009: Leitartenkarten für das Landwirtschaftsgebiet. Schweizerische Vogelwarte, Sempach.
- HADFIELD, J.D., 2010: MCMC methods for multi-response generalized linear mixed models: the MCMCglmm R package. *Journal of Statistical Software* 33: 1–22.
- HALE, M.L.; BURG, T.M.; STEEVES, T.E., 2012: Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25–30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. *PlosOne* 7: e45170
- HOBAN, S.; ARNTZEN, J.A.; BRUFORD, M.W.; GODOY, J.A.; HOELZEL, R.; SEGELBACHER, G.; VILA, C.; BERTORELLE, G., 2014: Comparative evaluation of potential indicators and temporal sampling protocols for monitoring genetic erosion. *Evolutionary Applications* 7: 984–998.
- HOLDEREGGER, R., 2017: Genetik im Naturschutz: eine Übersicht. *WSL Berichte* 60: 7–13.
- HOLDEREGGER, R.; DI GIULIO, M., 2010: The genetic effects of roads: a review of empirical evidence. *Basic and Applied Ecology* 11: 522–531.
- HOLDEREGGER, R.; SEGELBACHER, G. (Hrsg.), 2016: Naturschutzgenetik. Ein Handbuch für die Praxis. Haupt, Bern.
- ISMAIL, S.; SCHWAB, F.; TESTER, U.; KIENAST, F.; MARTINOLI, D.; SEIDL, I., 2009: Kosten eines gesetzestkonformen Schutzes der Biotope von nationaler Bedeutung. WSL, Birmensdorf.

- JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N.A., 2007: CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801–1806.
- KALINOWSKI, S.T., 2005: Do polymorphic loci require large sample sizes to estimate genetic distances? *Heredity* 94: 33–36.
- KÉRY, M., 2008: Grundlagen der Bestandserfassung am Beispiel von Vorkommen und Verbreitung. *Ornithologischer Beobachter* 105: 353–386.
- KELLY, R.P.; PORT, J.A.; YAMAHARA, K.M.; MARTONE, R.G.; LOWELL, N.; THOMSEN, P.F.; MACH, M.E.; BENNETT, M.; PRAHLER, E.; CALDWELL, M.R.; CROWDER, L.B., 2014: Harnessing DNA to improve environmental management. *Hide Science* 344: 1455–1456.
- LEUENBERGER, J.; GANDER, A.; SCHMIDT, B.R.; PERRIN, N., 2014: Are invasive marsh frogs (*Pelophylax ridibundus*) replacing the native *P. lessonae*/*P. esculentus* hybridogenetic complex in Western Europe? Genetic evidence from a field study. *Conservation Genetics* 15: 869–878.
- MARSCHALEK, D.A.; JESU, J.A.; BERRES, M.E., 2013: Impact of non-lethal genetic sampling on the survival, longevity and behaviour of the Hermes copper (*Lycaena hermes*) butterfly. *Insect Conservation and Diversity* 6: 658–662.
- MEIRMANS, P.G., 2015: Seven common mistakes in population genetics and how to avoid them. *Molecular Ecology* 24: 3223–3231.
- Microsynth; ecogenics, 2018: Nachweis von Amphibien-DNA mittels Barcoding und Deep-Sequencing. *Rechtobler Gmäändsblatt* 2018(8): 22.
- PFISTER, A., 2004: Rahmenplan LEK, Ziel- und Leitarten im Kanton Zug. Baudirektion Kanton Zug, Zug.
- PIRY, S.; ALAPETITE, A.; CORNUET, J.-M.; PAETKAU, D.; BAUDOUIN, L.; ESTOUP, A., 2004: GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* 95: 536–539.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P., 2000: Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- TABERLET, P.; BONIN, A.; ZINGER, L.; COISSAC, E., 2018: Environmental DNA for biodiversity research and monitoring. Oxford University Press, Oxford.
- SCHMIDT, B.R.; GRÜNIG, C.R., 2017: Einsatz von eDNA im Amphibien-Monitoring. *WSL Berichte* 60: 57–62.
- SCHMIDT, B.R.; URSENBACHER, S., 2015: Umwelt-DNA als neue Methode zum Artnachweis in Gewässern. *Zeitschrift für Feldherpetologie* 22: 1–10.
- SEGELBACHER, G.; STRAND, T.M.; QUINTELA, M.; AXELSSON, T.; JANSMAN, H.A.H.; KOELEWIJN, H.P.; HÖGLUND, J., 2014: Analyses of historical and current populations of black grouse in Central Europe reveal strong effects of genetic drift and loss of genetic diversity. *Conservation Genetics* 15: 1183–1195.
- SMART, A.S.; TINGLEY, R.; WEEKS, A.R.; VAN ROOYEN, A.R.; MCCARTHY, M.A., 2015: Environmental DNA sampling is more sensitive than a traditional survey technique for detecting an aquatic invader. *Ecological Applications* 25: 1944–1952.
- Umwelt und Energie Kanton Luzern, 2007: Liste der besonders empfohlenen Leitarten für die naturschutzrelevanten Lebensräume des Kantons Luzern. Umwelt und Energie Kanton Luzern, Luzern.
- VALENTINI, A.; TA, M.; TABERLET, P.; MIAUD, D.; CIVADE, R.; HERDER, J.; THOMSON, P.F.; BELLEMAIN, E.; BESNARD, A.; COISSAC, E.; BOYER, F.; GABORIAUD, C.; JEAN, P.; POULET, N.; ROSET, N.; COPP, G.H.; GENIEZ, P.; PONT, D.; ARGILLIER, C.; BAUDOUIN, J.-M.; PEROUX, T.; CRIVELLI, A.J.; OLIVIER, A.; ACQUEBERGE, M.; LE BRUN, M.; MOLLER, P.R.; WILLERSLEV, E.; DEJEAN, T., 2016: Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 25: 929–942.
- WALTER, T.; EGGENBERG, S.; GONSETH, Y.; FIVAZ, F.; HEDINGER, C.; HOFER, G.; KLIEBER-KÜHNE, A.; RICHNER, N.; SCHNEIDER, K.; SZERENCSEITS, E.; WOLF, S., 2012: Operationalisierung der Umweltziele Landwirtschaft. Bereich Ziel- und Leitarten, Lebensräume (OPAL). ART, Reckenholz-Tänikon.
- WILSON, G.A.; RANNALA, B., 2003: Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163: 1177–1191.

Verzeichnis der neusten WSL Berichte

Analyse des événements de la situation avalancheuse de janvier 2018. Bründl, M.; Hafner, E.; Bebi, P.; Bühler, Y.; Margreth, S.; Marty, C.; Schaer, M.; Stoffel, L.; Techel, F.; Winkler, K.; Zweifel, B.; Schweizer, J., 2019. WSL Ber. 80. 162 S.

Waldschutzüberblick 2018. Queloz, V.; Forster, B.; Beenken, L.; Stroheker, S.; Odermatt, O.; Hölling, D.; Meyer, J.B.; Dubach, V., 2019. WSL Ber. 79. 33 S.

Lernen aus Extremereignissen. Forum für Wissen 2019, Davos. Bründl, M.; Schweizer, J. (eds), 2019. WSL Ber. 78. 73 S.

Schnee und Lawinen in den Schweizer Alpen. Hydrologisches Jahr 2017/18. Winkler, K.; Zweifel, B.; Marty, C.; Techel, F., 2019. WSL Ber. 77. 135 S.

Ereignisanalyse Lawinensituation im Januar 2018. Bründl, M.; Hafner, E.; Bebi, P.; Bühler, Y.; Margreth, S.; Marty, C.; Schaer, M.; Stoffel, L.; Techel, F.; Winkler, K.; Zweifel, B.; Schweizer, J., 2019. WSL Ber. 76. 162 S.

Geschäftsbericht. Eidg. Forschungsanstalt WSL 2018. Eidg. Forschungsanstalt WSL (Hrsg.) 2019. WSL Ber. 75. 78 S.

Naturgefahr Steinschlag – Erfahrungen und Erkenntnisse. Gerber, W., 2019. WSL Ber. 74. 149 S.

Naturnahe Freiräume in der Schweiz: Analysekonzept, Identifizierung und raumplanerische Sicherung? Nischik, G; Pütz, M., 2018. WSL Ber. 73: 80 S.

TreeNet – Daten und Analysen der ersten fünf Messjahre. Etzold, S.; Zweifel, R.; Haeni, M.; Burri, S.; Braun, S.; Walthert, L.; Dawes, M.; Buchmann, N.; Haeler, E.; Köchli, R.; Schaub, M.; Eugster, W., 2018. WSL Ber. 72. 69 S.

Energiegenossenschaften in der Schweiz: Ergebnisse einer Befragung. Rivas, J.; Schmid, B.; Seidl, I., 2018. WSL Ber. 71. 106 S.

Situazione fitosanitaria dei boschi 2017. Queloz, V.; Dubach, V. (Ed.), 2018. WSL Ber. 70. 35 S.

Bases stationnelles pour la gestion forestière face au changement climatique. Frehner, M.; Brang, P.; Kaufmann, G.; Küchli, C., 2018. WSL Ber. 69. 44 S.

Protection des forêts – vue d'ensemble 2017. Queloz, V.; Dubach, V. (Ed.), 2018. WSL Ber. 68. 35 S.

Waldschutzüberblick 2017. Queloz, V.; Dubach, V. (Ed.), 2018. WSL Ber. 67. 35 S.

Standortkundliche Grundlagen für die Waldbewirtschaftung im Klimawandel. Frehner, M.; Brang, P.; Kaufmann, G.; Küchli, C., 2018. WSL Ber. 66. 49 S.

Instrumente zum Schutz des Kulturlandes: Ein Vergleich der Schweiz mit ausgewählten europäischen Ländern. Leuthard, J.; Tobias, S., 2018. WSL Ber. 65. 82 S.

Geschäftsbericht der Eidg. Forschungsanstalt WSL 2017. Eidg. Forschungsanstalt WSL (Hrsg.) 2018. WSL Ber. 64. 86 S.

Kulturanleitungen für Waldbäume und Wildsträucher. Anleitungen zur Samenernte, Klengung, Samenlagerung und Samenausbeute sowie zur Anzucht von Baum- und Straucharten. Burkart, A., 2018. WSL Ber. 63: 104 S.

Welche Informationsquellen nutzt die Schweizer Naturschutzpraxis? Fabian, Y.; Bollmann, K.; Brang, P.; Heiri, C.; Olschewski, R.; Rigling, A.; Stofer, S.; Holderegger, R., 2018. WSL Ber. 62: 64 S.

Schnee und Lawinen in den Schweizer Alpen. Hydrologisches Jahr 2016/17. Zweifel, B.; Pielmeier, C.; Marty, C.; Techel, F., 2017. WSL Ber. 61: 79 S.

Csencsics, D.; Gugerli, F. (Eds.) 2017. Forum für Wissen 2017: Naturschutzgenetik. WSL Ber. 60: 82 S.

Situazione fitosanitaria dei boschi 2016. Meier, F.; Forster, B.; Odermatt, O.; Hölling, D.; Meyer, J.; Dubach, V.; Schneider, S.; Wasem, U.; Queloz, V., 2017. WSL Ber. 59: 36 S.